

УДК 579.61; 615.012.6

КОНТРОЛЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК БЦЖ-ВАКЦИНЫ В ПРОЦЕССЕ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА МЕТОДОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АТФ-МЕТРИИ

Н.Н. Угарова^{1*}, Г.Ю. Ломакина^{1,3}, Т.А. Перевышина², Е.В. Отрашевская²,
С.В. Черников²

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ²АО «НПО «Микроген»; ³МГТУ имени Н.Э. Баумана; *e-mail: nugarova@gmail.com)

БЦЖ-вакцина на основе живого штамма бактерий *Mycobacterium bovis* BCG широко применяется для иммунопрофилактики туберкулеза. Одно из ее важнейших свойств – жизнеспособность (специфическая активность, определяемая числом колониеобразующих единиц, КОЕ), для измерения которой традиционно используют микробиологические методы. В данной работе для контроля жизнеспособности БЦЖ-вакцины на разных этапах ее производства применяли быстрый, селективный билюминесцентный метод измерения внутриклеточного АТФ, что позволило сократить время анализа с 28 суток до 1 ч. Установлена корреляция между жизнеспособностью жидкой БЦЖ-вакцины, измеренной микробиологическим методом и рассчитанной по количеству внутриклеточного АТФ, а также корреляция между жизнеспособностью лиофилизованной БЦЖ-вакцины и содержанием АТФ в жидкой вакцине перед лиофилизацией.

Ключевые слова: БЦЖ-вакцина, АТФ-метрия, жизнеспособность клеток, туберкулез, колониеобразующие единицы (КОЕ)

Использованные в статье сокращения: АТФ – аденозин-5'-трифосфат; КОЕ – колониеобразующие единицы.

Вакцина Кальметта–Герена (БЦЖ), широко применяемая для иммунопрофилактики туберкулеза, представляет собой лекарственный препарат на основе живого аттенуированного штамма бактерий *Mycobacterium bovis* BCG. Одна из ключевых характеристик БЦЖ-вакцины – жизнеспособность микобактерий (численность живых микроорганизмов), традиционно определяемая микробиологическим методом посевов разведений вакцины на питательную среду Левенштейна–Йенсена с последующим подсчетом образовавшихся колоний через 4–5 недель инкубации. Отсутствие возможности быстрого получения результатов анализа усложняет производственный процесс. Оперативное определение жизнеспособности на ключевых стадиях производства, в особенности на стадии подготовки жидкой вакцины к розливу и лиофилизации, необходимо для поддержания высокого качества финального продукта – лекарственного препарата. В настоящее время Европейская фармакопея позволяет использовать «пригодный» биохимический метод в качестве альтернативного для определения жизнеспособности микобактерий [1]. Наиболее быстрым биохимическим методом определения

жизнеспособности микобактерий считается билюминесцентный метод, основанный на измерении содержания внутриклеточного АТФ с использованием люциферин-люциферазной системы светляков. АТФ – чувствительный индикатор метаболической активности клеток. Жизнеспособность клеток пропорциональна количеству внутриклеточного АТФ, по величине которого можно определить содержание жизнеспособных клеток в единице объема или массы вакцины [2, 3]. Достоинство билюминесцентного метода состоит в уникальной специфичности фермента (люциферазы светляков) по отношению к АТФ и простота выполнения анализа. По чувствительности билюминесцентный метод определения жизнеспособности клеток намного превосходит традиционные спектрофотометрические и флуориметрические методы [4].

Попытка валидации билюминесцентного метода определения жизнеспособности микобактерий по содержанию внутриклеточного АТФ в лиофилизованной БЦЖ-вакцине предпринята в работе Йенсена [5]. Длительность анализа, включая стадию пробоподготовки образцов, составила 36 ч. Предложенный метод был апроби-

рован в производственных, контрольных и исследовательских лабораториях ряда стран с использованием образцов БЦЖ-вакцины штамма Danish 1331, изготовленных в Satens Serum Institut (Дания) [6]. Однако по разным причинам сходимость результатов межлабораторных испытаний оказалась недостаточной во многом, как мы полагаем, из-за использования довольно сложной методики пробоподготовки образцов. Позже АТФ-метод был модифицирован и использован для сравнительного анализа специфической активности различных вакцинных штаммов микобактерий [7, 8]. Были предприняты попытки [9, 10] оптимизировать и упростить стадию пробоподготовки образцов, однако большого прогресса достичь не удалось. В 2016 г. мы значительно оптимизировали метод измерения внутриклеточного АТФ в лиофилизованной БЦЖ-вакцине [11]. Упрощение стадий пробоподготовки образцов, экстракции внутриклеточного АТФ и измерения сигналов биолюминесценции позволили сократить продолжительность анализа с 36 до 1 ч.

В литературе [12] отмечается, что технология производства БЦЖ-вакцины и методы контроля ее жизнеспособности остаются практически неизменными с 1920-х годов. Это отчасти объясняет сложности, возникающие в процессе получения лекарственного препарата. Быстрый контроль жизнеспособности БЦЖ-вакцины на разных стадиях производственного цикла методом АТФ-метрии может помочь оперативно контролировать процесс получения стандартного лекарственного продукта. Литературные данные по использованию метода АТФ-метрии на разных стадиях процесса получения БЦЖ-вакцины отсутствуют [13]. Описано лишь применение АТФ-метода либо для сравнительного изучения различных штаммов микобактерий, либо для определения жизнеспособности финального, лиофилизованного продукта.

Цель данной работы – выявление корреляции между жизнеспособностью, измеренной микробиологическим методом (КОЕ), и содержанием внутриклеточного АТФ, измеренного с помощью разработанного нами биолюминесцентного метода [11] для жидкой БЦЖ-вакцины. Анализ полученных экспериментальных данных показал наличие удовлетворительной корреляции между двумя методами. Сравнение величин АТФ и КОЕ в БЦЖ-вакцине до и после лиофилизации позволило оценить долю погибших микобактерий на этапе лиофилизации и проанализировать возможные причины этого явления. Показано, что АТФ-метод может применяться для оценки жиз-

неспособности финальных, лиофилизованных препаратов БЦЖ-вакцины путем измерения АТФ для тех же препаратов перед их лиофилизацией.

Материалы и методы

Образцы жидкой БЦЖ вакцины. Использовали образцы клеточных суспензий живых микобактерий *Mycobacterium bovis*, субштамм Russian BCG-1 из экспериментальных серий жидкой вакцины, изготовленных на предприятии АО «НПО «Микроген».

Использованные реагенты. Для определения содержания внутриклеточного АТФ биолюминесцентным методом использовали набор лиофилизованных реагентов (ООО «Люмтек», Россия), включающий АТФ-реагент, АТФ-контроль и апиразу картофеля. В набор входили также диметилсульфоксид (ДМСО), стерильная деионизированная вода и физиологический раствор. АТФ-реагент [14], содержащий рекомбинантную термостабильную люциферазу *Luciola mingrelica* [15], люциферин, компоненты буфера и стабилизаторы, реконструировали в 2 мл воды и инкубировали в течение 15 мин. Апиразу реконструировали в физиологическом растворе до концентрации 5 ед./мл. Реконструированные растворы хранили при комнатной температуре и использовали в течение одного рабочего дня.

Измерение внутриклеточного АТФ биолюминесцентным методом. Образцы жидкой вакцины разбавляли физиологическим раствором до концентрации биомассы 0,5 мг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Из разбавленной суспензии отбирали по две пробы объемом по 100 мкл, вносили в стерильные пробирки, содержавшие по 20 мкл раствора апиразы, и инкубировали 10 мин при комнатной температуре для разрушения внеклеточного АТФ. Затем добавляли по 1 мл ДМСО для остановки апиразной реакции и экстракции внутриклеточного АТФ. Экстракт перемешивали и через 1 мин проводили измерение сигнала биолюминесценции в каждой пробе. Для этого в микрокювету объемом 240 мкл вносили 20 мкл экстракта, добавляли 100 мкл раствора АТФ-реагента, перемешивали и измеряли биолюминесцентный сигнал, (I_3), на люминометре «ЛЮМ-1» (ООО «Люмтек», Россия). Лيوфилизованный АТФ-контроль реконструировали в 1 мл физиологического раствора, отбирали по 100 мкл раствора АТФ-контроля в две пробирки, добавляли по 20 мкл физиологического раствора и 1 мл ДМСО, перемешивали и измеряли сигнал биолюминесценции (I_k) так же, как описано выше для экстракта. Содержание внутриклеточ-

точного АТФ (пмоль) в исходном образце вакцины рассчитывали по формуле (1):

$$(\text{АТФ}), \text{ пмоль} = (\text{АТФ})_k \times I_3 / I_k, \text{ пмоль}, \quad (1)$$

где $(\text{АТФ})_k$ – известное содержание АТФ в исходном растворе АТФ-контроля в физиологическом растворе (7,5 пмоль), I_3 – сигнал биолюминесценции для образца, отн. ед., I_k – сигнал биолюминесценции для АТФ-контроля, отн. ед.

Содержание АТФ в 1 мг биомассы рассчитывали по формуле (2), используя измеренную для образца величину АТФ и концентрацию биомассы в 1 мл жидкой вакцины (0,5 мг):

$$\begin{aligned} (\text{АТФ}), \text{ пмоль/мг} &= \\ &= (\text{АТФ}), \text{ пмоль} / \text{биомасса, мг} \end{aligned} \quad (2)$$

Специфическую активность (КОЕ/мг) жидкой и лиофилизованной БЦЖ-вакцины определяли микробиологическим методом, согласно работе [16]. Для посева разведений суспензии вакцины использовали стандартную плотную питательную (на яичной основе) среду Левенштейна–Йенсена, в состав которой входят глицерин, аспарагин, картофельный крахмал, соли и краситель малахитовый зеленый. Подсчет образовавшихся колоний проводили через 28–30 суток инкубации при 37 °С.

Статистический анализ проводили с помощью компьютерных программ Microsoft® Office Excel 2003 SPI и Origin 6.0.

Результаты и их обсуждение

Измерение АТФ и КОЕ в образцах жидкой БЦЖ-вакцины. На предприятии НПО «Микроген» были проанализированы образцы двадцати экспериментальных серий жидкой БЦЖ-вакцины, приготовленные в разное время на протяжении двух лет. Срок хранения жидкой вакцины перед анализом составлял от 2 до 5 суток при 4 °С. В отдельном эксперименте (данные не представлены) было показано, что после 5 суток хранения величины АТФ и КОЕ резко уменьшались, и следовательно, подобные образцы жидкой вакцины не использовались для получения финального продукта. Из каждой серии жидкой вакцины отбирали по два образца, измеряли в них АТФ (пмоль/мг) и делали посева разведений для измерения КОЕ (млнКОЕ/мг). Обе операции были синхронизированы. Величины АТФ получали через 30–40 мин после отбора проб, а величины КОЕ – через 4 недели после посева разведений. Экспериментальные результаты для образцов двадцати экспериментальных серий жидкой вакцины и результаты их обработки представлены в табл. 1.

Средняя величина АТФ для образцов двадцати серий вакцины составила $(114,4 \pm 23,2)$ пмоль/мг биомассы. Средняя величина $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$, измеренная микробиологическим методом (табл. 2), составила $(72,3 \pm 14,7)$ млнКОЕ/мг биомассы. В случае микробиологических измерений наблюдаемый разброс величин КОЕ допустим [7]. Для выявления грубых промахов и для проверки однородности выборки по результатам независимых определений АТФ и КОЕ во всех сериях жидкой вакцины (генеральная совокупность) применили правило трех сигм. Для каждой серии вакцины рассчитали случайные отклонения величин АТФ и $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ от их средних значений. Эти отклонения во всех случаях оказались значительно меньше 3SD. Таким образом, грубые промахи при измерении АТФ и $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ в данном случае отсутствовали.

Для каждой серии жидкой вакцины рассчитывали отношение $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ к АТФ (табл. 1):

$$K = (\text{млнКОЕ/мг}) / \text{АТФ (пмоль/мг)}, \quad (3)$$

и определили среднее значение коэффициента пропорциональности K :

$$K = (0,65 \pm 0,15) \text{ млнКОЕ} / \text{пмоль АТФ}$$

С помощью этого коэффициента для каждой серии жидкой вакцины рассчитывали величины $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ (табл. 1). В результате средние значения $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ и $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ (по содержанию АТФ) составили соответственно $(72,3 \pm 14,7)$ и $(74,4 \pm 15,1)$ млн/мг.

Средняя величина $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ близка к среднему значению $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$, измеренному микробиологическим методом. Как показано на рис. 1, расчетные и экспериментальные величины КОЕ попадают в один и тот же интервал для образцов всех серий (50–100 млн/мг жидкой вакцины).

Для оценки согласованности определений одной и той же величины КОЕ двумя методами (микробиологическим и биолюминесцентным) мы применяли графический метод Блэнда–Алтмана [17, 18]. Для каждой серии вакцины вычисляли разность двух величин ($\text{КОЕ}_{\text{эксп.}} - \text{КОЕ}_{\text{расч.}}$), определяли среднее значение и стандартное отклонение этой разности. Эти показатели характеризуют соответственно систематическое расхождение и степень разброса результатов. В качестве измеряемого признака использовали среднее значение пары измерений для каждой серии вакцины

$$\text{КОЕ}_{\text{ср.}} = (\text{КОЕ}_{\text{эксп.}} + \text{КОЕ}_{\text{расч.}}) / 2.$$

Как показано на рис. 2, разность $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}} - \text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ не зависит от измеряемого признака

Т а б л и ц а 1

Результаты измерений АТФ биолюминесцентным методом и КОЕ микробиологическим методом в жидкой БЦЖ-вакцине

Номер серии	Срок хранения вакцины, сутки	АТФ, пмоль/мг*	КОЕ _{эксп.} , млн/мг (посевы)	Содержание АТФ в одной клетке, аттомоль/КОЕ	$K = (\text{КОЕ}_{\text{эксп.}} / \text{АТФ})$	КОЕ _{расч.} = $K \times (\text{АТФ})$ при $K = 0,65$
1	5	121,4	88,6	1,37	0,73	78,9
2	2	149,1	65,7	2,27	0,44	96,9
3	3	143,9	74,3	1,94	0,52	93,5
4	5	93,4	64,8	1,44	0,69	60,7
5	2	152,0	92,8	1,64	0,61	98,8
6	2	104,7	80,6	1,30	0,77	68,1
7	5	77,9	52,8	1,48	0,68	50,6
8	2	124,3	89,1	1,39	0,72	80,8
9	5	90,0	53,8	1,67	0,60	58,5
10	2	120,8	82,6	1,46	0,68	78,5
11	5	124,5	45,2	2,75	0,36	80,9
12	3	122,8	51,0	2,40	0,42	79,8
13	3	140,3	70,0	2,00	0,50	91,2
14	3	83,0	67,2	1,23	0,81	54,0
15	5	82,7	57,9	1,43	0,70	53,8
16	3	85,0	83,2	1,02	0,98	55,3
17	3	103,5	71,1	1,46	0,69	67,3
18	5	124,8	92,4	1,35	0,74	81,1
19	3	123,0	80,5	1,53	0,65	80,0
20	5	121,1	82,1	1,47	0,68	78,7
Среднее для 20 серий вакцины		114,4	72,3	1,63	0,65	74,4
Стандартное отклонение, SD		23,2	14,7	0,43	0,15	15,1

* Среднее значение четырех измерений для образцов каждой серии вакцины, SD не более 5%.

(КОЕ_{ср.}), что указывает на отсутствие систематических погрешностей в использованных методах измерения КОЕ. Очевидно, что чем меньше разность КОЕ_{эксп.} – КОЕ_{расч.}, тем лучше сходимость результатов, полученных двумя методами. Значительное отрицательное отклонение этой разности от средней линии (КОЕ_{эксп.} – КОЕ_{расч.} = –2,1) наблюдали для пяти образцов (серии № 2, № 3, № 11, № 12 и № 13), а положительное отклонение – для одного образца (серия № 16). Данные для образцов этих серий показаны в табл. 1 жир-

ным шрифтом. Все остальные точки лежат в узком интервале, который можно принять за относительную норму. В результате расчета коэффициента Пирсона для генеральной совокупности значений КОЕ_{эксп.} и КОЕ_{расч.} ($n = 20$) получено значение 0,36, что указывает на наличие слабой корреляции между двумя методами определения КОЕ. Однако данный критерий неустойчив к таким выбросам, какие наблюдаются для образцов указанных выше серий. Если отбросить эти пограничные значения и провести расчет для

Т а б л и ц а 2

Влияние лиофилизации на свойства БЦЖ-вакцины (расчет КОЕ для лиофилизованной вакцины по АТФ в жидкой вакцине)

Номер серии	Экспериментальная величина				Соотношение экспериментальных величин КОЕ _л и АТФ _ж	Расчетное КОЕ для лиофилизованной вакцины по АТФ в жидкой вакцине
	АТФ, пмоль/мг*		КОЕ _{эксп.} , млнКОЕ/мг			
	АТФ _ж	АТФ _л	КОЕ _ж	КОЕ _л	$K_1 = \text{КОЕ}_{\text{эксп.}} / \text{АТФ}_{\text{ж}}$	КОЕ _{расч.} при $K_1 = 0,17$
1	121,4	55,3	88,6	20,2	0,19	20,6
2	149,1	68,9	65,7	19,3	0,13	25,3
3	143,9	63,8	74,3	19,3	0,16	24,5
4	93,4	38,8	64,8	14,8	0,17	15,9
5	152,0	65,3	92,8	18,9	0,13	25,8
6	104,7	44,1	80,6	19,4	0,19	17,8
7	77,9	33,8	52,8	19,7	0,26	13,2
8	124,3	40,1	89,1	17,6	0,15	21,1
9	90,0	52,8	53,8	16,4	0,19	15,3
10	120,8	–	82,6	21,6	0,18	20,5
11	124,5	–	45,2	14,4	0,12	21,2
12	122,8	–	51,0	16,4	0,13	20,9
13	140,3	–	70,0	18,1	0,13	23,8
14	83,0	–	67,2	15,6	0,19	14,1
15	82,7	–	57,9	16,2	0,20	14,1
16	85,0	–	83,2	19,0	0,22	14,5
17	103,5	–	71,1	–	–	17,6
18	124,8	–	92,4	20,4	0,16	21,2
19	123,0	–	80,5	20,9	0,17	20,9
20	121,1	–	82,1	21,3	0,18	20,6
Среднее значение	114,4	51,4	72,3	18,4	0,17	19,4
Стандартное отклонение	23,2	12,8	14,7	2,9	0,04	3,9

О б о з н а ч е н и я. АТФ_ж и АТФ_л – содержание АТФ в жидкой и лиофилизованной вакцинах соответственно, КОЕ_ж и КОЕ_л – экспериментальные значения КОЕ для жидкой и лиофилизованной вакцин.

*Среднее значение четырех измерений для образцов каждой серии вакцины (SD не более 5%); прочерк означает, что измерения не проводили.

новой выборки ($n = 14$), коэффициент Пирсона увеличивается до 0,91. Тем не менее, выбросы наблюдаемые при определении величины разности $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}} - \text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ для образцов из серий, указанных выше, лежат в пределах $\pm 2\text{SD}$, что свидетельствует о наличии корреляции между биолюминесцентным и микробиологическим методами определения КОЕ для жидкой БЦЖ-вакцины.

Образцы различных серий вакцины отличаются по удельному содержанию внутриклеточного АТФ в расчете на одну клетку микобактерий (табл. 2). Среднее содержание АТФ в одной клетке микобактерий, рассчитанное по генеральной совокупности экспериментальных данных ($n = 20$), составляет $(1,63 \pm 0,43)$ аттомоль АТФ/КОЕ. Величина стандартного отклонения составляет

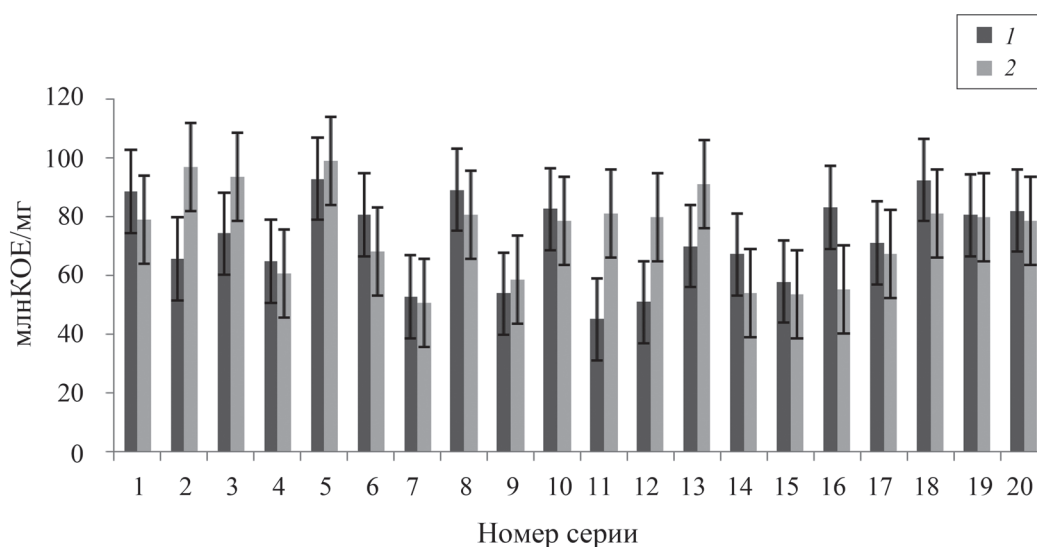


Рис. 1. Жизнеспособность образцов из различных серий жидкой БЦЖ-вакцины: 1 – измеренная микробиологическим методом ($KOE_{\text{эксп.}}$), 2 – рассчитанная по содержанию внутриклеточного АТФ ($KOE_{\text{расч.}}$); отмечены стандартные отклонения

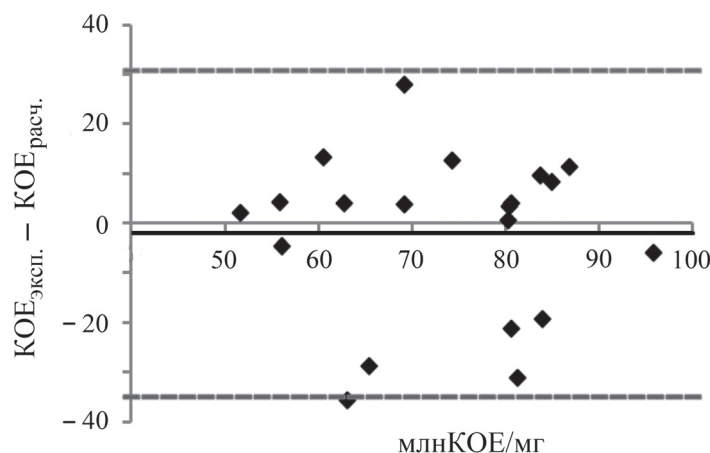


Рис. 2. Диаграмма Блэнда–Алтмана для оценки согласованности результатов двух методов определения КОЕ для образцов жидкой БЦЖ-вакцины: микробиологического ($KOE_{\text{эксп.}}$) и билюминесцентного ($KOE_{\text{расч.}}$). По оси абсцисс отложено среднее значение $KOE_{\text{ср.}} = (KOE_{\text{эксп.}} + KOE_{\text{расч.}})/2$, по оси ординат – разность ($KOE_{\text{эксп.}} - KOE_{\text{расч.}}$) для образцов каждой серии жидкой вакцины. Сплошная линия – среднее значение разности значений двух методов. Пунктирной линией показано стандартное отклонение этой разности ($\pm 2SD$)

~28%. Если уменьшить выборку до $n = 14$, исключив из нее пограничные значения (рис. 2), то стандартное отклонение становится существенно ниже. В этом случае среднее содержание АТФ в одной клетке жидкой БЦЖ-вакцины составляет $(1,43 \pm 0,12)$ аттомоль АТФ/КОЕ. Вероятно, полученное значение удельного содержания АТФ в одной клетке жидкой БЦЖ-вакцины можно принять за относительную норму для расчета среднестатистических показателей.

Наблюдаемый разброс величин АТФ и КОЕ для образцов из разных серий жидкой БЦЖ-вакцины

объясняется, прежде всего, биологическими особенностями клеток микобактерий. Содержание внутриклеточного АТФ зависит не только от численности клеток в образце, но и от их энергетического статуса, т.е. от содержания АТФ в расчете на одну клетку микобактерий (табл. 1). Свойства посевного материала, условия наращивания биомассы, условия ее обработки и хранения оказывают заметное влияние на оба параметра. Для образца вакцины серии № 16 величина $KOE_{\text{эксп.}}$ в 1,5 раза превышает величину $KOE_{\text{расч.}}$. Это можно объяснить тем, что клетки микобактерий

этой серии имеют пониженный энергетический статус: содержание внутриклеточного АТФ составляет всего 1,02 аттомоль АТФ/КОЕ. Величина $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ оказалась в 1,4–2,0 раза ниже, чем величина $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ в образцах серий № 2, № 3, № 11, № 12 и № 13. Это можно объяснить склонностью клеток микобактерий к слипанию и агрегации, особенно при высокой концентрации клеток в образце. При этом число колоний, учитываемых при определении КОЕ микробиологическим методом, будет меньше числа клеток в исходной

суспензии, и измеряемая величина $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$ окажется заниженной. Высокое содержание АТФ в образцах указанных выше серий свидетельствует о высокой концентрации живых клеток и/или об их высоком энергетическом статусе, что и может приводить к заниженной величине $\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$.

Влияние лиофилизации на свойства БЦЖ-вакцины. Образцы жидкой вакцины лиофильно высушивали, затем лиофилизат реконструировали в физиологическом растворе и определяли КОЕ микробиологическим методом, а АТФ – био-

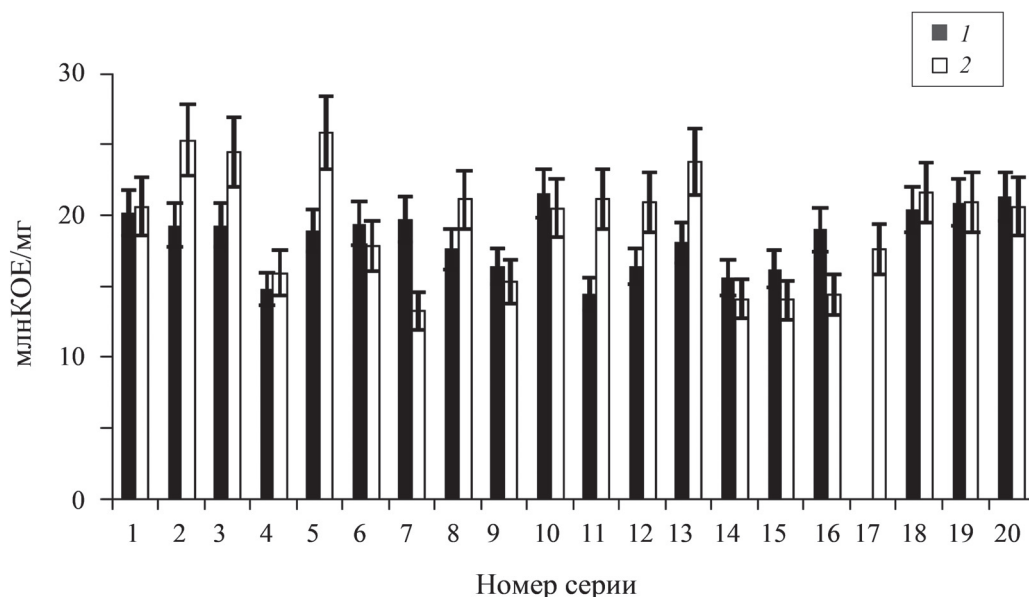


Рис. 3. Жизнеспособность образцов из разных серий лиофилизованной БЦЖ-вакцины: 1 – измеренная микробиологическим методом ($\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$), 2 – рассчитанная по содержанию АТФ в жидкой вакцине ($\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$); отмечены стандартные отклонения

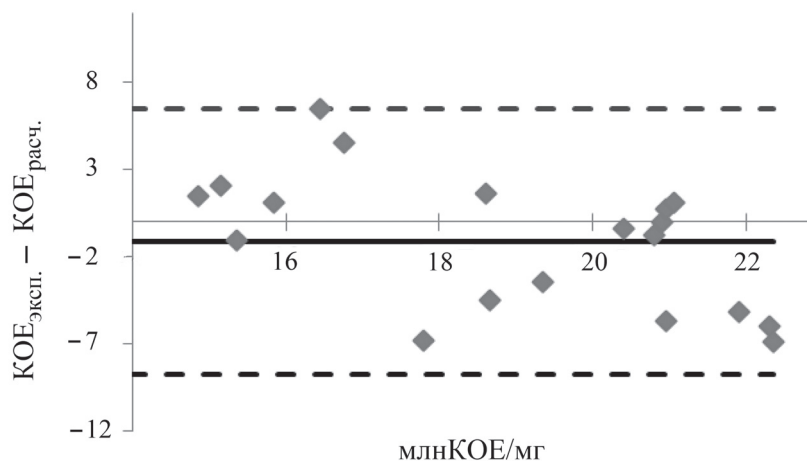


Рис. 4. Диаграмма Блэнда–Алтмана для оценки согласованности результатов двух методов определения КОЕ для образцов различных серий БЦЖ-вакцины после их лиофилизации: микробиологического ($\text{КОЕ}_{\text{эксп.}}$) и билюминесцентного ($\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$, расчет по содержанию АТФ в жидкой вакцине). Обозначения те же, что на рис. 2

люминесцентным методом, как описано в [11]. Согласно экспериментальным данным, представленным в табл. 2, лиофилизация жидкой вакцины приводит к снижению средней величины АТФ в $\sim 2,2$ раза, а величины КОЕ – в $\sim 3,9$ раза. При этом среднее содержание АТФ/КОЕ не только не уменьшается, но и возрастает с 1,63 до $\sim 2,8$ аттомоль АТФ/КОЕ. Наблюдаемый эффект можно объяснить следующим. Вероятно, в жидкой вакцине содержатся как более, так и менее жизнеспособные клетки. В процессе длительного инкубирования все эти клетки способны образовывать колонии, по численности которых и фиксируется величина КОЕ для жидкой вакцины (от 50 до 100 млнКОЕ/мг биомассы). Замораживание и лиофилизация вакцины, несомненно, вызывают сильный стресс клеток, и не исключено, что при этом «выживают» в основном клетки с высокой метаболической активностью. Клетки с низкой метаболической активностью либо разрушаются, либо их жизнеспособность снижается настолько, что они становятся не способными к образованию колоний. Образцы жидкой и реконструированной после лиофилизации БЦЖ-вакцины содержат некоторое количество внеклеточного АТФ, который накапливается в среде за счет АТФ, вытекающего из клеток при их повреждении. В отдельных экспериментах было показано (результаты не приведены), что содержание внеклеточного АТФ в образцах реконструированной после лиофилизации БЦЖ-вакцины увеличилось на 15–20% по сравнению с исходной жидкой вакциной.

Анализ данных табл. 2 показал, что наблюдается пропорциональная зависимость между $\text{КОЕ}_{\text{экс.}}$ для лиофилизованной вакцины и содержанием АТФ в жидкой вакцине с коэффициентом пропорциональности K_1 , средняя величина которого составляет $(0,17 \pm 0,04)$ млнКОЕ/пмоль АТФ. С использованием данного коэффициента были рассчитаны величины $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ (табл. 2) для образцов лиофилизованной БЦЖ-вакцины

по величине АТФ в жидкой вакцине. Средние значения $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ для лиофилизованной БЦЖ-вакцины составляют $(19,4 \pm 3,9)$ млнКОЕ/мг, что близко к средней величине $\text{КОЕ}_{\text{экс.}}$, равной $(18,4 \pm 2,9)$ млнКОЕ/мг биомассы. Согласно спецификации на выпускаемый лекарственный препарат «вакцина туберкулезная (БЦЖ)», величина КОЕ для него может варьировать в пределах от 13 до 25 млнКОЕ/мг биомассы. Как показано на рис. 3, для лиофилизованной БЦЖ-вакцины обе величины КОЕ (как экспериментальная, так и расчетная) попадают в этот интервал.

Для лиофилизованной БЦЖ-вакцины мы применяли также метод Блэнда–Алтмана, чтобы оценить согласованность между величинами КОЕ, определенными двумя методами – микробиологическим и биолюминесцентным.

Как показано на рис. 4, в случае лиофилизованной вакцины величины $\text{КОЕ}_{\text{экс.}}$ и $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$ для образцов всех серий лежат в пределах $\pm 2SD$. Это означает, что и для лиофилизованной БЦЖ-вакцины существует корреляция между величинами $\text{КОЕ}_{\text{экс.}}$, измеренными микробиологическим методом, и $\text{КОЕ}_{\text{расч.}}$, рассчитанными по содержанию внутриклеточного АТФ в жидкой вакцине. Следовательно, измерив АТФ в образцах жидкой вакцины перед началом лиофилизации, можно предсказать, какова будет жизнеспособность клеток в этих образцах после лиофилизации. Таким образом, АТФ-метод позволяет осуществлять оперативный контроль жизнеспособности БЦЖ-вакцины на стадии ее производства, что необходимо для обеспечения высокого качества выпускаемого лекарственного препарата.

Работа выполнена в рамках государственной темы МГУ имени М.В. Ломоносова № АААА-А16-116052010081-5 и при финансовой поддержке АО НПО «Микроген» (договоры № 702/16 и № 400/17).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ho M.M., Corbel M.J., Knezevic I., Roumiantzeff M. // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. N 50. P. 5700.
2. Lundin A. // *Methods of Enzymology*. 2000. Vol. 305. P. 346.
3. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 6. С. 829.
4. Stefanova T. // *Biotechnol. Biotechnol. Equipment*. 2014. Vol. 28. N 3. P. 387.
5. Jensen S.E., Hubrechts P., Klein B.M., Haslow K.R. // *Biologicals*. 2008. Vol. 36. N 5. P. 308.
6. Ho M.M., Markey K., Rigsby P., Jensen S.E., Gairola S., Seki M., Castello-Branco L.R., López-Vidal Y., Knezevic I., Corbel M.J. // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. N 36. P. 4754.
7. Kolibab K., Derrick S.C., Jacobs W.R., Morris S.L. // *J. Microbiol. Meth.* 2012. Vol. 90. N 3. P. 245.
8. Soni G.R. // *Guidance manual of quality control of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine*. 2014. P. 3.
9. Jadaun G.P., Kasana H., Malik N. // *SOJ Vaccine Res.* 2015. Vol. 1. N 1. P. 1.

10. Jin T.H., Qu T., Raina A., Alexander P., Tsao E. // *J. Vaccines & Vaccin.* 2016. Vol. 7. N 1. P. 2.
11. Ugarova N.N., Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Chernikov S.V., Vinokurova N.V., Otrasheskaya E.V., Gorbachev V.Y. // *J. Microbiol. Meth.* 2016. Vol. 130. N 1. P. 48.
12. Cernuschi T., Malvolti S., Nickels E., Friede M. // *Vaccine.* 2018. Vol. 36. N 4. P. 498.
13. WHO. Expert Committee on Biological Standardization // *Sixty-second report.* Geneva, WHO. 2014. Annex 3. P. 139.
14. Пат. РФ. № 2420594. Б.И. 2011. № 16.
15. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Prot. Engin. Des. Selec.* 2011. Vol. 24. N 11. P. 835.
16. WHO/TB/Technical guide/77/9. *In vitro assay of BCG products.* 1977. P. 1.
17. Bland J.M., Altman D.G. // *Lancet.* 1986. Vol. 327. P. 307.
18. Giavarina G. // *Biochem. Medica.* 2015. Vol. 25. N 2. P. 141.

Поступила в редакцию 18.12.2018
Получена после доработки 16.01.2019
Принята к публикации 18.01.2019

IN PROCESS CONTROL OF BCG VACCINE CELL VIABILITY BY BIOLUMINESCENT ATP ASSAY

N.N. Ugarova^{1*}, G.Yu. Lomakina^{1,3}, T.A. Perevyshina², E.V. Otrasheskaya², S.V. Chernikov²

(¹ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; ² JSC "SIC "Microgen"; ³ Bauman Moscow State Technical University; * e-mail: nugarova@gmail.com)

The BCG vaccine based on a live strain of *Mycobacterium bovis* BCG is widely used for the immunoprophylaxis of tuberculosis. One of the BCG vaccine key parameters is its cell viability (specific activity – the number of colony forming units, CFU), which is traditionally defined by microbiological method. In this work, the rapid and selective bioluminescent method of intracellular ATP assay was used to control the BCG vaccine viability at various stages of the vaccine production. It permitted to reduce the analysis time from 28 days up to 1 hour. The correlation was shown between the viability of liquid BCG vaccine, measured by microbiological method and calculated using the content of intracellular ATP, as well as the correlation between the CFU value for the lyophilized BCG vaccine and the ATP content in liquid vaccine before lyophilization.

Key words: BCG vaccine, ATP assay, cell viability, tuberculosis, colony forming units (CFU)

Сведения об авторах: Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com); Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com); Перевышина Татьяна Андреевна – специалист АО Микроген (tatyana_perevyshina@mail.ru); Отрашевская Елена Викторовна – специалист АО Микроген (e.v.otrashevskaja@microgen.ru); Черников Сергей Витальевич – специалист АО Микроген (bioafp@yandex.ru).