

## Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатных для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей

А. А. Троценко\*, М. В. Коврижко, Э. А. Яговкин, В. С. Ванжа, А. А. Решетов

Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Газетный пер., 119/262/157, Ростов-на-Дону, 344000, Российская Федерация

Лептоспироз является одним из широко распространенных зоонозных заболеваний в России. Для снижения рисков, связанных с осложнением эпидемиологической обстановки, применяется лептоспирозная вакцина для человека, производимая с 1998 г. ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. В настоящее время увеличилась заболеваемость людей лептоспирозом, вызванным *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola*, отсутствующим в составе производимой лептоспирозной вакцины для людей. **Цель работы:** изучить биологические свойства штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* для обоснования их включения в вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую для людей. **Материалы и методы:** в исследовании были использованы два штамма лептоспир серовара *Canicola*: № 480 Удалов и Собака 2000. Оценка вирулентных свойств штамма проводили путем инфицирования золотистых хомячков. Данные, полученные для серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность», сравнивали с соответствующими данными серий вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания. Экспериментальную вакцину испытывали по показателям «Специфическая безопасность» и «Аномальная токсичность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая. **Результаты:** при проведении сравнения вирулентности двух штаммов лептоспир серовара *Canicola* № 480 Удалов и Собака 2000 было выявлено, что более высокой вирулентностью обладает *L. interrogans Canicola* штамм № 480 Удалов. Испытания полученных серий экспериментальной вакцины показали, что включение в нее вышеуказанного штамма не приводит к изменению изученных свойств вакцины. **Выводы:** подтверждена возможность введения в состав производимой вакцины штамма № 480 Удалов *L. interrogans Canicola*, а также ее эффективность и безопасность.

**Ключевые слова:** лептоспироз; *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola*; вакцина; вакцинопрофилактика; защитный титр антител; антигенные свойства

**Для цитирования:** Троценко АА, Коврижко МВ, Яговкин ЭА, Ванжа ВС, Решетов АА. Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатных для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(1):64–69. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-64-69>

\***Контактное лицо:** Троценко Александр Александрович; aatrozenko@gmail.com

## Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine

A. A. Trotsenko\*, M. V. Kovrizhko, E. A. Yagovkin, V. S. Vanzha, A. A. Reshetov

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology,  
119/262/157 Gazetny lane, Rostov-On-Don 344000, Russian Federation

Leptospirosis is a widespread zoonosis in Russia. The human leptospirosis vaccine produced by Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology has been used since 1998 to minimise risks associated with deterioration of epidemiological situation. Lately, there has been an increase in the incidence of leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* which is not included in the human vaccine. **The aim of the study** was to analyse biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains to substantiate their inclusion into human leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine. **Materials and methods:** two *L. interrogans* serovar *Canicola* strains: Udalov 480 and Sobaka 2000 were used in the study. Virulent properties of the strains were evaluated by infecting Syrian hamsters, the data on specific activity of the experimental vaccine were compared to specific activity of the leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine used for disease prevention. The experimental vaccine was tested for Specific safety and Abnormal toxicity according to FS.3.3.1.0014.15 *Leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine*. **Results:** the comparison of Udalov 480 and Sobaka 2000 strains of *L. interrogans* serovar *Canicola* revealed higher virulence of Udalov 480. The tests performed for the experimental vaccine batches demonstrated that the inclusion of Udalov 480 strain did not affect the above-mentioned properties of the vaccine. **Conclusions:** the study demonstrated the possibility of using *L. interrogans* serovar *Canicola* strain Udalov 480 as a component of the currently produced vaccine, and confirmed the safety and efficacy of the new vaccine.

**Key words:** leptospirosis; *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*; vaccine; preventive vaccination; protective antibody titer; antigenicity

**For citations:** Trotsenko AA, Kovrizhko MV, Yagovkin EA, Vanzha VS, Reshetov AA. Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine.

Лептоспирозы занимают лидирующие позиции среди зоонозов по широте распространения природных и антропоургических очагов в Российской Федерации. Вакцинопрофилактика лептоспироза является важной составной частью общих противозидемических и профилактических мероприятий, проводимых при этой инфекции<sup>1</sup>.

С целью специфической профилактики в нашей стране с 1998 г. применяется вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая<sup>2</sup>. В вакцине используются культуры четырех серогрупп: *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni* (Крыса 2/466), *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa (Microtus arvalis 30/469)*, *L. interrogans Pomona mozdok (48B/470)*, *L. interrogans Sejroe sejoere (Mus musculus 751/471)*, которые соответствуют эпидемиологической ситуации в Российской Федерации и странах СНГ.

Применение в системе противозидемических мероприятий отечественной лептоспирозной вакцины обеспечило значительное снижение уровня заболеваемости людей лептоспирозом [1]. Аналогичные результаты демонстрирует также и зарубежный опыт внедрения вакцин против лептоспироза [2, 3]. На сегодня цельноклеточные инактивированные вакцины являются единственным зарегистрированным типом иммунобиологических лекарственных препаратов для превентивной борьбы с заражением людей лептоспирами [4].

Лептоспироз относится к числу природно-очаговых инфекций, вызываемых лептоспирами, насчитывающими около 250 сероваров [5]. При этом происходит постоянная смена возбудителей в разных регионах мира, в том числе в Российской Федерации. В связи с этим качество вакцины и ее противозидемические показатели во многом определяются соответствием состава входящих в нее штаммов штаммам, циркулирующим в природе. В настоящее время в России и в мире увеличивается количество заболеваний лептоспирозом, вызываемым *L. interrogans* серогруппы *Canicola* [6–8], что требует введения в состав выпускаемой в России лептоспирозной вакцины для людей штамма *L. interrogans* серогруппы *Canicola*. Особую опасность для людей представляют домашние собаки, которые являются резервуаром каникулезного лептоспироза [9].

Цель работы — изучить биологические свойства штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* для обоснования их включения в вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую для людей.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) изучить вирулентные свойства штаммов *L. interrogans* серогруппы *Canicola*;
- 2) получить серии экспериментальной вакцины в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую;
- 3) провести сравнительное изучение образования специфических антител к лептоспирам в экспериментальной вак-

цине и в вакцине, применяемой для профилактики лептоспироза;

- 4) подтвердить соответствие экспериментальной вакцины требованиям ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая по показателям «Специфическая безопасность» и «Аномальная токсичность»<sup>3</sup>.

## Материалы и методы

### Материалы

1. Рекомендуемые штаммы-кандидаты для включения в состав вакцины:

- *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* № 480 Удалов, выделенный от больного лептоспирозом человека;
- *L. interrogans* серогруппы *Canicola* Собака 2000, выделенный из почки больной собаки.

Вышеуказанные штаммы-кандидаты находились в коллекции лептоспир в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и были получены сотрудниками ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Разрешение на использование штаммов-кандидатов для проведения работ по внедрению в применяемую вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую было получено от ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Пять серий экспериментальной вакцины были произведены в период с 2018 по 2020 г. в лаборатории по научной разработке, внедрению и выпуску микробиологических и вирусологических препаратов ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. Форма выпуска — суспензия 0,5 мл/доза. В течение срока исследования экспериментальную вакцину хранили в соответствии с СП 3.3.2.3332-16<sup>4</sup> при температуре от 2 до 8 °С. Показатель «Специфическая активность» контролировали с учетом проверки антигенности штамма № 480 Удалов *L. interrogans Canicola*. Серии экспериментальной вакцины были проверены по показателям «Аномальная токсичность», «Специфическая безопасность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая<sup>5</sup>.

2. После контроля каждой серии экспериментальной вакцины данные по показателю «Специфическая активность» сравнивали с протоколами испытаний серий вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, выпущенной в гражданский оборот (номера серий: 1-0518, 2-0818, 1-0219, 2-0719, 1-0720).

3. Исследование серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность» выполняли на аутбредных сирийских золотистых хомячках в возрасте 3–4 недели (массой (22±3) г).

4. Исследование серий экспериментальной вакцины по показателю «Аномальная токсичность» проводили на белых нелинейных мышях обоего пола (массой 19–21 г) и на морских свинках (массой 250–300 г).

<sup>1</sup> Методические указания 3.1.1128–02 Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами.

<sup>2</sup> <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>3</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

<sup>4</sup> Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 17.02.2016 № 19.

<sup>5</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Лабораторные животные были выращены в условиях конвенционального вивария ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60% в условиях свободного доступа к корму и воде на стандартном рационе кормления. При проведении экспериментов соблюдали общепринятые этические нормы обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях<sup>6</sup>, и в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

### Методы

1. Вирулентные свойства возбудителей *L. interrogans* серогруппы *Canicola* изучали на экспериментальных животных (золотистые хомячки).

В опыте использовали три группы животных по три особи в каждой группе. Первую группу заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов с содержанием 180×190 клеток лептоспир в дозе 1,0 мл в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200, вторую группу заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм Собака 2000, с содержанием 180×190 клеток лептоспир в дозе 1,0 мл в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200. Контрольной третьей группе вводили внутрибрюшинно раствор натрия хлорида 0,9% в объеме 1,0 мл.

Оценку вирулентных свойств возбудителей проводили на пятые сутки после заражения экспериментальных животных культурой лептоспир, основываясь на результатах, полученных при вскрытии золотистых хомячков и посева коркового слоя почек этих животных в бактериологические пробирки со средой Терских. Посевы инкубировали в течение 7 сут в термостате при температуре (28±1) °С. Затем отбирали 0,02 мл микробной взвеси и просматривали не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении ×200.

2. Пять серий экспериментальной вакцины получали в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инaktivированную жидкую. Экспериментальная вакцина состоит из смеси инaktivированных концентрированных культур лептоспир четырех серогрупп (*Leptospira interrogans lcterohaemorrhagiae copenhageni* (Крыса 2/466), *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa* (*Microtus arvalis* 30/469), *L. interrogans Pomona mozdok* (48B/470), *L. interrogans Sejroe sejroe* (*Mus musculus* 751/471)) с добавлением штамма-кандидата № 480 Удалов *L. interrogans* серогруппы *Canicola*.

Инактивацию лептоспир проводили 30% раствором формальдегида, добавляя его в культуральную жидкость до концентрации 0,35%, и выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Через указанный промежуток времени делали мазки и микроскопировали в темном поле зрения при увеличении ×200. Просматривали не менее 30 полей зрения. Критерием

того, что инактивация прошла в полном объеме, являлось отсутствие активных движений лептоспир при сохранении морфологии клеток.

3. Идентификацию штаммов лептоспир, входящих в состав экспериментальной вакцины, проводили с помощью перекрестной реакции микроагглютинации с эталонными контрольными штаммами лептоспир, входящими в состав диагностического набора Сыворотки групповые агглютинирующие лептоспирозные (ФКП «Армавирская биофабрика») в соответствии с инструкцией по применению.

4. Подсчет количества клеток лептоспир в экспериментальной вакцине осуществляли по методу А.П. Власовой, А.С. Фоменко [10], который основан на выявлении соотношения между площадью поля зрения и площадью, занимаемой исследуемой культурой, распределенной под покровным стеклом 18×18 мм, с учетом кратности увеличения оптической системы микроскопа, объема взятой культуры, среднего числа лептоспир в поле зрения микроскопа и кратности разведения культуры. Расчет проводили по формуле (1):

$$K = (3570,4 \times 50 \times M) / 2, \quad (1)$$

где  $K$  — число лептоспир в 1 мл; 3570,4 — коэффициент, указывающий, во сколько раз площадь распределения культуры под стеклом превышает площадь поля зрения; 50 — коэффициент, указывающий, во сколько раз объем 1 мл превышает объем исследуемой культуры;  $M$  — среднее число лептоспир в поле зрения [8]. Анализировали пять ампул экспериментальной вакцины по 0,02 мл и просматривали в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200. Рассчитанный по формуле результат делили на 2, с учетом дозировки экспериментальной вакцины.

5. Образование специфических антител в защитных титрах к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины, изучали по показателю «Специфическая активность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инaktivированная жидкая<sup>7</sup>, где отмечено, что препарат должен вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в реакции микроагглютинации со штаммами лептоспир в титре не менее чем 1:100, защищать не менее 3 из 4 животных от заражения вирулентной культурой. В эксперименте на каждую серию вакцины использовали по 3 золотистых хомячка для иммунизации экспериментальной вакциной и по две группы золотистых хомячков по 4 особи в каждой (4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных)) для проведения теста активной защиты<sup>8</sup>.

Золотистым хомячкам массой (22±3) г однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл экспериментальной вакцины. Через 20 сут после иммунизации у животных забирали кровь, собирали ее во флаконы (пробирки) и инкубировали в термостате в течение 30–40 мин при температуре (37±1) °С, затем выдерживали в холодильнике при температуре (6±2) °С в течение 24 ч. Для выявления специфических антител полученную иммунную сыворотку крови отбирали в стерильные пробирки и проводили реакцию микроагглютинации. В качестве антигенов использовали штаммы лептоспир, входящие в состав экспериментальной вакцины. Учет результатов реакции проводили

<sup>6</sup> European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Strasbourg; 1986.

<sup>7</sup> Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 170). Strasbourg; 1998.

<sup>8</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инaktivированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

<sup>8</sup> Там же.

визуально по условной системе оценок трех крестов<sup>9</sup>. Для определения защитных свойств экспериментальной вакцины 4 золотистым хомячкам массой (22±3) г однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут 4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных) животных заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов с содержанием 180×190 клеток лептоспир в темном поле зрения при увеличении ×200 в объеме 1 мл. Наблюдение за животными вели в течение 7 сут. Отбор образцов экспериментальной вакцины для данного эксперимента осуществляли методом случайного отбора<sup>10</sup>.

6. Оценку серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая безопасность» проводили микробиологическим методом (метод прямого посева) на среду Терских. По 0,2 мл экспериментальной вакцины засеивали в 3 бактериологические пробирки с 7 мл фосфатно-сывороточной среды Терских. Пробирки помещали в термостат и выдерживали при температуре (28±1) °C в течение 20 сут. Через указанный промежуток времени делали мазки и микроскопировали в темном поле зрения при увеличении ×200. Просматривали не менее 30 полей зрения. Критерием оценки теста на специфическую безопасность являлось отсутствие в посевах живых лептоспир.

7. Оценку серий экспериментальной вакцины по показателю «Аномальная токсичность» проводили биологическим методом в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность в тесте для иммунобиологических лекарственных препаратов<sup>11</sup>.

8. Статистическая обработка данных. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее геометрическое значение титров антител.

При подсчете количества клеток лептоспир в экспериментальной вакцине проводили статистическую обработку данных с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее арифметическое значение (*M*) и стандартное отклонение (*SD*).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проводили исследования по оценке вирулентных свойств изучаемых штаммов. Золотистые хомячки, зараженные *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, пали на пятые сутки. У погибших животных при вскрытии была отмечена выраженная желтушность и многочисленные кровоизлияния на слизистых оболочках и в подкожной клетчатке, наиболее интенсивные в области скелетных мышц, почек, печени, желудка, селезенки. Наблюдался выраженный отек почечной и печеночной ткани, деструктивные и некротические изменения паренхимы органов. Почки были увеличены и имели размеры 11,3×6 мм при норме 7,5×4 мм у хомячков в возрасте 3 недель. При посеве коркового слоя почек на среду Терских выделялась культура лептоспир. Идентификация лептоспир, выделенных при посеве на среде Терских, показала, что культура соответствует серогруппе *Canicola*.

У животных, зараженных *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм Собака 2000, на пятые сутки было отмечено легкое угнетение, снижение аппетита. У животных этой группы на пятые сутки клинические признаки заболевания не проявлялись. При вскрытии хомячков обнаружена невыраженная желтушность

слизистых покровов и подкожной клетчатки. Макроскопических изменений внутренних органов не выявлено. При посеве коркового слоя почек животных на среду Терских не выделялась культура лептоспир.

Животные контрольной группы на пятые сутки клинических признаков заболевания не проявляли, при внешнем осмотре степень физической активности находилась в пределах физиологической нормы, поедаемость корма была нормальной, при взвешивании потери массы тела отмечено не было. При вскрытии животных отмечены чистые слизистые покровы, положение внутренних органов брюшной полости без изменений. Печень и почки красно-коричневого темного цвета, консистенция — плотная, эластичная; имели характерный рисунок на разрезе. Серозная оболочка кишечника гладкая, блестящая, без видимых изменений. Серозная оболочка желудка без очаговых поражений, некрозов, кровоизлияний, язв. Желтушность внутренних органов отсутствовала. Макроскопических изменений внутренних органов не выявлено. При посеве коркового слоя почек животных на среду Терских не выделялась культура лептоспир.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что наиболее вирулентным был *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов.

Следующим этапом работы было получение пяти серий экспериментальной вакцины, которые производили в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую, на базе лаборатории по научной разработке, внедрению и выпуску микробиологических и вирусологических препаратов ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора.

Для стандартизации смеси лептоспир, входящих в состав экспериментальной вакцины, был проведен подсчет микробных клеток (табл. 1). Количество клеток лептоспир в дозе 0,5 мл в экспериментальной вакцине составляла  $(20,9 \pm 2,5) \times 10^6$ , что соответствует требованиям, предъявляемым к применяемой для профилактики заболевания вакцине лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, то есть не менее  $(20 \pm 2) \times 10^6$  микробных клеток.

Далее были проведены исследования серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность», а именно проведена сравнительная оценка образования специфических антител к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины, и лептоспирам, входящим в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания (табл. 2).

Образование специфических антител у лабораторных животных после иммунизации экспериментальной вакциной (табл. 2) не изменяется при введении в ее состав *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, также отсутствует отрицательная конкуренция, приводящая к изменению антигенных свойств выпускаемой вакцины.

Проведены исследования оценки защитных свойств экспериментальной вакцины (по показателю «Специфическая активность»), в результате были получены следующие данные:

- золотистые хомячки, входящие в группу животных, иммунизированных экспериментальной вакциной, после заражения культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов на седьмые сутки клинических признаков заболевания не проявляли;

<sup>9</sup> Там же.

<sup>10</sup> Общая фармакопейная статья 1.1.0004.15 Отбор проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>11</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.



**Таблица 1.** Результаты подсчета клеток лептоспир пяти серий экспериментальной вакцины  
**Table 1.** Enumeration of leptospiral cells in five batches of the experimental vaccine

Номер серии экспериментальной вакцины Experimental vaccine batch number	Среднее арифметическое число (M) клеток лептоспир в поле зрения Arithmetic mean (M) of leptospiral cells per field of view	Среднее арифметическое число (M) клеток лептоспир Arithmetic mean (M) of leptospiral cells	Стандартное отклонение (SD) Standard deviation (SD)	Количество клеток лептоспир в экспериментальной вакцине (K) Number of leptospiral cells in the experimental vaccine (K)
1	212	234,4	28,4	$(20,9 \pm 2,5) \times 10^6$
2	284			
3	228			
4	224			
5	224			

**Таблица 2.** Сравнительная характеристика образования специфических антител к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины и вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики лептоспироза

**Table 2.** Formation of specific antibodies to leptospirae used as components in the experimental vaccine and in the leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine

Название препарата Product	Количество серий Number of batches	Среднее геометрическое значение титров антител к лептоспирам Geometric mean of antibody titers to leptospirae				
		<i>L. interrogans copenhageni</i> (Крыса 2/466) <i>L. interrogans copenhageni</i> (Krysa2/466)	<i>L. interrogans grippotyphosa</i> (Мишкет 30/469) <i>L. interrogans grippotyphosa</i> (Mishket 30/469)	<i>L. interrogans pomona mozdok</i> (48B/470)	<i>L. interrogans sejiro</i> (Mus musculus 751/471)	<i>L. interrogans canicola</i> штамм № 480 Удалов <i>L. interrogans canicola</i> (Udalov 480)
Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, применяемая для профилактики заболевания Leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine used for disease prevention	5	1:151	1:200	1:229	1:174	—
Экспериментальная вакцина со штаммом <i>L. interrogans</i> серогруппы <i>Canicola</i> (№ 480 Удалов) Experimental vaccine including <i>L. interrogans</i> serovar <i>Canicola</i> (Udalov 480)	5	1:131	1:174	1:263	1:151	1:151

*Примечание.* «—» означает, что в составе вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания, отсутствует *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов.

*Note.* — *L. interrogans* serovar *Canicola* (Udalov 480) is not used as a component in the currently produced liquid concentrated inactivated human vaccine.

- золотистые хомячки, входящие в группу животных, не иммунизированных экспериментальной вакциной (контрольную), пали на пятые сутки.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что *L. interrogans canicola* штамм № 480 Удалов в составе экспериментальной вакцины вызывает образование антител в защитных титрах не менее 1:100, что соответствует требованиям, предъявляемым к вакцине лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой<sup>12</sup>.

В результате проверки серий экспериментальных вакцин, полученных с использованием *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, по показателю «Специфическая безопасность» было установлено, что препарат не содержит живых лептоспир.

В ходе исследования серий экспериментальных вакцин, полученных с использованием *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, по показателю «Аномальная

токсичность» было выявлено, что у лабораторных животных (белые мыши и морские свинки) в течение 7 сут не наблюдались изменений в области введения вакцин, падения массы тела, гибели животных, что свидетельствует о его нетоксичности и безопасности.

### Заключение

Испытания полученной экспериментальной вакцины показали, что включение в ее состав *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов не приводит к изменению свойств вакцины; вакцина соответствует требованиям, изложенным в ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая по показателям «Аномальная токсичность», «Специфическая безопасность» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Введенный в состав вакцины штамм *L. interrogans* серогруппы *Canicola* вызвал образование антител в защитных

<sup>12</sup> Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

титрах не менее 1:100, что свидетельствует о достаточной антигенности экспериментальной вакцины и подтверждает целесообразность его включения в выпускаемую отечественную лептоспирозную вакцину для повышения ее эпидемиологической эффективности.

Вакцина с обновленным составом штаммов микроорганизмов будет наиболее актуальна для регионов, в которых присутствуют природные и антропогенные резервуары *L. interrogans* серогруппы *Canicola*.

**Вклад авторов.** **А. А. Троценко** — разработка концепции эксперимента, микробиологические посе́вы, получение экспериментальных серий вакцины, постановка реакции микроагглютинации, определение специфической безопасности, редактирование текста; **М. В. Коврижко** — микробиологические посе́вы, получение экспериментальных серий вакцины, постановка реакции микроагглютинации, определение специфической безопасности, редактирование текста рукописи; **Э. А. Яговкин** — разработка концепции эксперимента, составление текста рукописи; **В. С. Ванжа** — определение аномальной токсичности, оценка вирулентных свойств штаммов микроорганизмов; **А. А. Решетов** — статистическая обработка результатов, подготовка табличного материала.

**Authors' contributions.** **Aleksandr A. Trotsenko**—elaboration of the experiment, carrying out microbiological culturing, production of the experimental vaccine batches, performing the microagglutination test, assessment of specific safety, editing of the text; **Marina V. Kovrizhko**—carrying out microbiological culturing, production of the experimental vaccine batches, performing the microagglutination test, assessment of specific safety, editing of the text; **Eduard A. Yagovkin**—elaboration of the experiment, drafting of the paper; **Vladislav S. Vanzha**—assessment of abnormal toxicity, evaluation of the virulent properties of the strains; **Aleksandr A. Reshetov**—statistical processing of the results, preparation of the tables.

**Благодарности.** Исследования проводились без спонсорской поддержки.

**Acknowledgements.** The study was performed without financial support.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in the article.

## Литература/References

1. Вачаев БФ, Яговкин ЭА, Ананьина ЮВ, Юрьева ИЛ, Саяпина ЛВ, Кондратенко ВФ. Перспективы применения и совершенствования лептоспирозной вакцины для людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*.

2012;(4):68–72. [Vachayev BF, Yagovkin EA, Ananyina YuV, Yuryeva IL, Sayapina LV, Kondratenko VF. Prospects of application and improvement of leptospiral vaccine for people. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012;(4):68–72 (In Russ.)]

2. Verma R, Khanna P, Chawla S. Whole-cell inactivated Leptospirosis vaccine: future prospects. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(4):763–5. <https://doi.org/10.4161/hv.23059>

3. Xu Y, Ye Q. Human leptospirosis vaccines in China. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(4):984–93. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1405884>

4. Felix CR, Siedler BS, Barbosa LN, Timm GR, McFadden J, McBride AJA. An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(2):179–88. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508>

5. Levett PN. Systematics of *Leptospiraceae*. In: Adler B, eds. *Leptospira and Leptospirosis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 387. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. P. 11–20.

6. Ананьина ЮВ. Лептоспирозы людей и животных. Тенденции распространения и проблемы профилактики. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010;(2):13–6. [Ananyina YuV. Human and animal leptospiroses: prevalence trends and preventive measures. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*. 2010;(2):13–6 (In Russ.)]

7. Стоянова НА, Бадра Б, Токаревич НК. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу и ее эпидемиологическое проявление в условиях Санкт-Петербурга. В кн.: *Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных*. М.; 2007. С. 63–4. [Stoyanova NA, Badra B, Tokarevich NK. Epizootic situation in leptospirosis and its epidemic manifestation in the conditions of St. Petersburg. In: *Diagnostika, profilaktika i lechenie leptospiroza lyudei i zhivotnykh*. Moscow; 2007. P. 63–4 (In Russ.)]

8. Соболева ГЛ, Ананьина ЮВ, Непоклонова ИВ. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. *Российский ветеринарный журнал*. 2017;8:14–8. [Soboleva GL, Ananyina YuV, Nepoklonova IV. Actual problems of human and animal leptospirosis. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal = Russian Veterinary Journal*. 2017;8:14–8 (In Russ.)]

9. Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B, Galloway R. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Vet Res*. 2015;11(31). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0341-9>

10. Власова НП, Фоменко АС. К определению количества лептоспир в жидких питательных средах. В кн.: *Актуальные проблемы лептоспироза*. М.; 1979. С. 3. [Vlasova NP, Fomenko AS. Determination of the amount of leptospira in liquid nutrient media. In: *Topical problems of leptospirosis*. Moscow; 1979. P. 3 (In Russ.)]

## Об авторах / Authors

**Троценко Александр Александрович.** Aleksandr A. Trotsenko. SPIN-код РИНЦ: 3902-9200

**Коврижко Марина Владимировна.** Marina V. Kovrizhko. SPIN-код РИНЦ: 9954-5142

**Яговкин Эдуард Александрович.** д-р мед. наук. Eduard A. Yagovkin, Dr. Sci. (Med.). SPIN-код РИНЦ: 8743-4099

**Ванжа Владислав Сергеевич.** Vladislav S. Vanzha. SPIN-код РИНЦ: 5732-2813

**Решетов Александр Анатольевич.** Aleksandr A. Reshetov. SPIN-код РИНЦ: 9511-4405

Статья поступила 14.12.2020

После доработки 11.02.2021

Принята к печати 26.02.2021

Received 14 December 2020

Revised 11 February 2021

Accepted 26 February 2021