



Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки

С. В. Иванова, Л. А. Мельникова, А. П. Родионов, В. В. Евстифеев

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Сибирская язва — особо опасная инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. В настоящее время данное заболевание широко распространено во многих странах мира. Некоторые регионы Российской Федерации являются эндемичными по сибирской язве. Большое число средств терапии, диагностики и профилактики сибиреязвенной инфекции разрабатываются на основе гипериммунных сывороток крови. Известные в настоящее время коммерческие сыворотки крови получают путем гипериммунизации лошадей, длящейся в течение 2 мес. и представляющей длительный и дорогостоящий процесс. Данный факт свидетельствует о необходимости разработки более быстрых и дешевых способов получения гипериммунных противосибиреязвенных сывороток крови, что и явилось целью работы. В опыте использовали живую культуру вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ *Bacillus anthracis*, который применяется в России для создания живых лекарственных препаратов против сибирской язвы животных. В качестве модели для получения сывороток крови были выбраны кролики. В результате проведенной работы подобран способ гипериммунизации кроликов, включающий внутривенное введение антигена в нарастающем объеме по схеме: I инъекция — 0,5 см³; II инъекция — 1 см³; III инъекция — 2 см³ в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ с интервалом между введениями 4 сут. Указанная схема дала возможность получить сыворотку крови с высоким титром антител, равным 14 log₂. Для долгосрочного хранения полученной сыворотки отработан режим ее лиофилизации, позволивший достичь остаточной влажности готового препарата в 2%. При изучении длительности хранения лиофилизированной сыворотки было установлено, что исходная активность и физико-химические свойства препарата сохраняются в течение 30 мес.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, гипериммунизация, сыворотка, антиген, сибирская язва, антитела

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Разработка серологической тест-системы для исследования напряженности иммунитета у животных, вакцинированных против сибирской язвы в реакции непрямой геммагглютинации».

Для цитирования: Иванова С. В., Мельникова Л. А., Родионов А. П., Евстифеев В. В. Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 215–221. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 420075, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок-2, e-mail: alexandrjetspets@gmail.com.

Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum

S. V. Ivanova, L. A. Melnikova, A. P. Rodionov, V. V. Evstifeev

FSBSI "Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety" (FSBSI "FCTRBS-ARRVI"), Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

SUMMARY

Anthrax is a highly dangerous disease of animals and humans caused by the spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. Currently, the disease is widespread in many countries of the world. Many regions of the Russian Federation are anthrax-endemic. A large number of anthrax treatment, diagnosis and prevention tools are developed using hyperimmune serum. Currently known commercial hyperimmune sera are produced by 2-month long immunization of horses, which is a long and expensive process. This suggests the need to develop faster and cheaper ways to produce anti-anthrax hyperimmune sera; such possible ways became the objective of this study. A live culture of *Bacillus anthracis* 55-VNIIVViM vaccine strain, used to produce live vaccines against animal anthrax, was used in the experiments. Rabbits were used as animal models. Based on the findings the method of rabbit immunization was selected. The optimal method included intravenous injection of the antigen in increasing amounts according to the following scheme: injection I — 0.5 cm³; injection II — 1 cm³; injection III — 2 cm³ at a dose of 100 million mc/animal in 1 cm³, with 4-day interval between injections. This scheme made it possible to produce the serum with a high antibody titer equal to 14 log₂. For long-term storage of the serum produced, the freeze-drying modes were optimized, giving 2% residual moisture content of the finished product. The analysis of the freeze-dried serum storage terms showed that the initial activity and physico-chemical properties of the product are maintained for 30 months.

Keywords: *Bacillus anthracis*, immunization, serum, antigen, anthrax, antibodies

Acknowledgements: The work was financed by the "FSBSI Federal Centre for Toxicological, Radiation and Biological Safety" as part of the research work devoted to the development of HA test kit for testing of animals vaccinated against anthrax for immunity levels.

For citation: Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Evstifeev V. V. Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 215–221. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCRBS-ARRVI", 420075, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Nauchnyi gorodok-2, e-mail: alexandrvtspets@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва – смертельно опасное инфекционное заболевание, вызываемое спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis* [1, 2]. На сегодняшний день вспышки данной инфекции продолжают регистрировать как среди животных, так и среди людей во многих странах мира [3–5]. Кроме того, существует постоянный риск заноса заболевания с территории других государств [6]. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, в 2019 г. сибирскую язву регистрировали в 46 странах мира, в 2020 г. – в 23, в 2021 г. – в 22, в 2022 г. – в 16 [7]. Многие регионы Российской Федерации являются эндемичными по сибирской язве [8, 9]. В основном заболевание носит спорадический характер, вовлекая в инфекционный процесс небольшое число животных. Однако произошедшая на Ямале вспышка сибирской язву демонстрирует риск осложнения ситуации [10, 11]. Данный факт увеличивает актуальность разработки и получения средств диагностики, профилактики и терапии этой особо опасной инфекции.

В процессе разработки тест-системы «Набор определения титра антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против сибирской язву в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)» [12] необходимо проводить ее стандартизацию, в том числе определять активность антигена. Кроме того, при определении уровня антител у вакцинированных животных требуется постановка контрольной реакции с заведомо позитивной сывороткой крови. Впоследствии данная сыворотка должна будет входить в состав разработанного диагностического набора.

Известные в настоящее время коммерческие гипериммунные сыворотки крови получают путем длительной (в течение 2 мес.) гипериммунизации лошадей [13]. Данный факт свидетельствует о необходимости поиска более быстрых и дешевых способов получения гипериммунных противосибиреязвенных сывороток крови. Новизна настоящей работы заключается в том, что предложена схема гипериммунизации кроликов, позволяющая получать в короткий срок высокоактивную противосибиреязвенную гипериммунную сыворотку крови.

Исходя из этого, была поставлена цель разработать способ получения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки крови, которая будет служить в качестве контроля при постановке серологической реакции для определения уровня антител у вакцинированных против сибирской язву животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм. В качестве иммунизирующего антигена использовали вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis* (pX01+/pX02–).

Питательные среды. Для культивирования *B. anthracis* использовали мясо-пептонный агар (МПА) и мясо-пептонный бульон (МПБ), 5%-й кровяной агар, 12%-й желатин, обезжиренное молоко и бульон Хоттингера производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Россия).

Лабораторные животные. С целью получения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки были отобраны кролики породы шиншилла, прошедшие 30-дневный карантин, весом 2,5–3,0 кг. Всего использовали 15 животных, из которых сформировали 3 группы по 5 гол. в каждой.

При проведении экспериментов на животных были соблюдены требования Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Реактивы и тест-системы. Для смыва культуры с поверхности агара, а также в качестве разбавителя при выполнении РНГА применяли 0,9%-й раствор натрия хлорида (ООО «Гротекс», Россия).

При постановке РНГА использовали сибиреязвенный антигенный эритроцитарный диагностикум (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия).

Методы. Биологические свойства штамма изучали согласно МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язву»¹.

Суспензию для иммунизации лабораторных животных концентрацией 100 и 500 млн м. к. в 1 см³, в зависимости от схемы, готовили из штамма, выращенного на МПА при температуре 37 °С в течение 2 сут.

Контроль титра нарастания антител проводили каждые 3 сут перед следующим введением антигена в РНГА, которую ставили согласно инструкции к используемому диагностикуму в U-образных серологических макропанелях (ООО «МиниМед», Россия). Во все лунки макропанели многоканальной пипеткой вносили по 0,2 см³ 0,9%-го раствора натрия хлорида. В первые лунки рядов вносили полученную и контрольную (негативную) сыворотки крови в объеме 0,2 см³, последовательными переносами получали двукратные разведения. После приготовления соответствующих разведений сывороток во все лунки вносили 0,05 см³ (50 мкл) суспензии сибиреязвенного антигенного эритроцитарного диагностикума. Панели осторожно шуттелировали для смешивания компонентов реакции и оставляли при температуре от 10 до 20 °С на 1,5–2,0 ч. После экспозиции производили учет реакции.

Взятие крови у животных-продуцентов проводили тотально из сердца. Кровь собирали в стерильные сте-

¹ МУК 4.2.2413-08 Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язву: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 69 с. Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293752/4293752010.pdf>.

клянные цилиндры, стенки которых смачивали 0,9%-м раствором натрия хлорида, помещали в термостат для свертывания на 45–60 мин, после чего сгусток отделяли от стенок цилиндра круговыми движениями стеклянной стерильной палочкой и ставили в холодильник при температуре 4 °С на 24 ч. Отделившуюся сыворотку крови декантировали со сгустка стерильной пипеткой после проверки активности.

Лиофилизацию сывороток крови проводили на установке LZ-9.2 (Frigera, Чехия).

Полученную сыворотку оценивали по следующим показателям: внешний вид, цвет, наличие или отсутствие примесей, растворимость, активность в процессе длительного хранения, массовая доля влаги в лиофилизированном препарате.

Внешний вид, цвет, наличие или отсутствие примесей регистрировали визуально.

Для определения растворимости во флаконы с сывороткой вносили 1 см³ 0,9%-го раствора натрия хлорида. После этого флаконы встряхивали и наблюдали за растворением сухой массы.

Активность полученной сыворотки крови в процессе длительного хранения в лиофилизированном виде при температуре 4 °С определяли через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36 и 42 мес. в РНГА с эритроцитарным антигенным сибирезвенным диагностикумом. Значения активности сыворотки учитывали в log₂.

Определение массовой доли влаги лиофилизированной сыворотки осуществляли согласно ГОСТ 24061-2012².

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Результаты исследований представлены в виде $M \pm S_D$, где M – среднее значение, S_D – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,01$ (после пересчета на число сравнений) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первым этапом работы было изучение основных биологических свойств штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*.

После посева штамма на МПА и МПБ и культивирования в течение 24 ч определяли культуральные, морфологические, тинкториальные свойства, регистрировали наличие или отсутствие подвижности.

На МПА наблюдали плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии (рис. 1А) с затемненным центром и бахромчатой периферией с локонообразными отростками (рис. 1В).

Через 24 ч после посева в МПБ среда осталась прозрачной, на дне образовался рыхлый осадок в виде комочка ваты (рис. 1С). При встряхивании пробирки бульон не мутнел, осадок с трудом разбивался на мелкие хлопья.

Из бульонной культуры делали мазки, окрашивали по Граму и микроскопировали. В мазках обнаруживали типичные цепочки, состоящие из сибирезвенных палочек, окрашенных грамположительно (рис. 1D).

При проведении исследования установили, что штамм 55-ВНИИВВиМ обладает типичными для своего вида биологическими свойствами (табл. 1).

² ГОСТ 24061-2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200103299>.

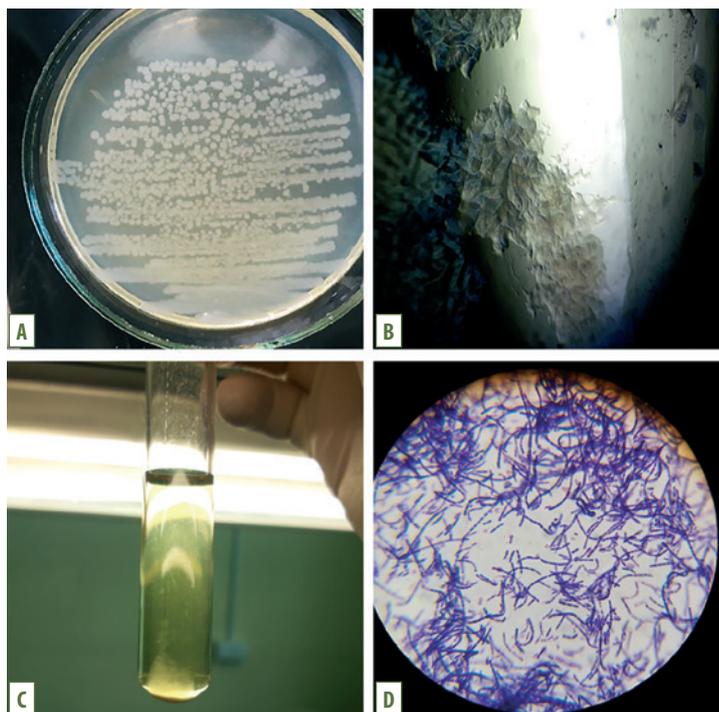


Рис. 1. Морфологические признаки штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*: А – форма колоний в R-форме на МПА; В – локонообразные отростки колоний *B. anthracis* (8 × 40); С – характерные признаки роста *B. anthracis* в МПБ в виде комочка ваты; D – морфология клеток *B. anthracis*, окрашенных по Граму

Fig. 1. *B. anthracis* 55-VNIIVViM morphology: А – R-shaped colonies on MPA; В – *B. anthracis* 'curly hair' colonies (8 × 40); С – *B. anthracis* typical 'cotton wool'-like growth in MPB; D – morphology of Gram-stained *B. anthracis* cells

Таблица 1
Характеристика основных биологических свойств штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*

Table 1
Major biological properties of *B. anthracis* 55-VNIIVViM strain

№ п/п	Показатель (свойство)	Значение показателя штамма 55-ВНИИВВиМ <i>B. anthracis</i>	Значение показателя по определителю Берджи
1	Подвижность	–	–
2	Гемолитические свойства	–	–
3	Протеолитические свойства: 12%-й желатин обезжиренное молоко	+ +	+ +
4	Капсулообразование	–	–
5	Чувствительность к пенициллину	+	+
6	Спорообразование	+	+

«+» – наличие свойства (positive result); «–» – отсутствие свойства (negative result).

Следующим этапом работы было изыскание оптимальной схемы иммунизации лабораторных животных для получения активной гипериммунной сибирезвенной сыворотки. Подготовленный антиген вводили тремя способами: 1) в нарастающем объеме внутривенно: I инъекция – 0,5 см³; II инъекция – 1,0 см³; III инъекция – 2,0 см³ в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ с интервалом между введениями 4 сут; 2) внутривенно

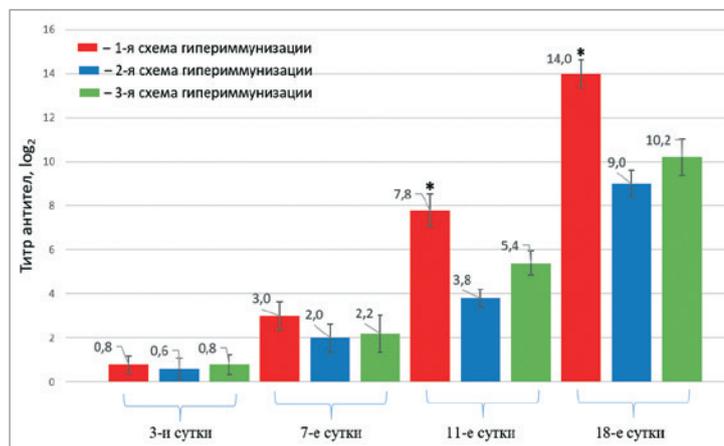


Рис. 2. Динамика нарастания титра специфических антител в сыворотках крови гипериммунизированных кроликов (* статистически значимое различие, $p < 0,01$)

Fig. 2. Specific antibody titre dynamics in sera of hyperimmunized rabbits (* statistically significant difference, $p < 0.01$)

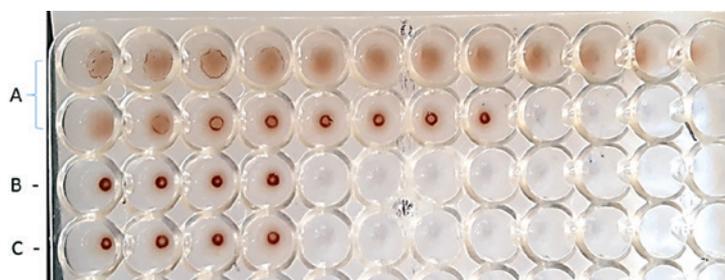


Рис. 3. Активность полученной гипериммунной сыворотки крови кроликов в РНГА с эритроцитарным сибиреязвенным антигеном: А – реакция с полученной гипериммунной сывороткой крови (титр антител 14 log₂); В – реакция с нормальной сывороткой крови (сыворотка крови неиммунизированного животного); С – реакция с физиологическим раствором

Fig. 3. Activity of produced hyperimmune rabbit sera tested by HA test using RBC anthrax antigen: A – reaction to produced hyperimmune serum (antibody titre 14 log₂); B – reaction to normal serum (serum of non-immunized animal); C – reaction to saline solution

Таблица 2
Параметры различных режимов лиофилизации сыворотки крови

Table 2
Different modes of serum freeze-drying

Дни	Режим № 1		Режим № 2	
	время	этап	время	этап
1-й	11:30	1. Включение аппарата	8:00	1. Включение аппарата
	12:00	2. Загрузка сывороток в лиофильную сушку при -35 °С	8:30	2. Загрузка сывороток в лиофильную сушку при -35 °С
	16:00	3. Отключение охлаждения при -37 °С	16:00	3. Отключение охлаждения при -36 °С
2-й	8:00	1. Включение нагрева (t в камере +10 °С)	8:00	1. Включение нагрева (t в камере +10 °С)
	11:00	2. Отключение аппарата (t в камере +35 °С)	11:00	2. Отключение аппарата (t в камере +35 °С)

однократно в дозе 500 млн м. к./гол. в 1 см³; 3) внутривенно двукратно в дозе 100 млн м. к./гол. в 1 см³ вдоль позвоночного столба в пять точек с каждой стороны с интервалом между введениями 5 сут.

В процессе иммунизации кроликов каждые 3 сут проводили контроль динамики нарастания титра антител путем взятия крови и постановки РНГА. Применение вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ возбудителя сибирской язвы в качестве антигена позволило получить активную иммунную сибиреязвенную сыворотку. Результаты определения активности гипериммунной сыворотки крови кроликов при трех схемах гипериммунизации представлены на рисунке 2.

В течение всего периода гипериммунизации лабораторных животных наблюдали нарастание титра антител. Наибольший уровень специфических антител в сыворотках крови кроликов наблюдали при иммунизации, выполненной по первой схеме: после введения антигена к 18-м сут титр достигал значения 14 log₂, что равнозначно разведению сыворотки 1:16384 (рис. 3). Поэтому данную схему в дальнейшем использовали при разработках диагностических препаратов.

Сыворотки крови, используемые в качестве компонентов диагностических тест-систем, лучше сохраняют активность и легче транспортируются в лиофилизированном состоянии [15]. С этой целью были проведены исследования по подбору режима лиофилизации. Для этого лиофильную сушку сывороток крови осуществляли при двух различных режимах (табл. 2).

В результате сравнения двух режимов сублимационной сушки было установлено, что режим № 1 позволяет лиофилировать сыворотку в однородную консистенцию белого цвета с кремовым оттенком (рис. 4А). В то время как режим № 2, в котором процесс сублимации занимал более длительное время, приводил к излишней сухости полученного препарата (рис. 4В).

После лиофилизации был проведен контроль качества полученной сыворотки, физико-химические и биологические показатели которой представлены в таблице 3.

При проверке стабильности полученной лиофилизированной сыворотки крови в процессе длительного хранения при температуре 4 °С было установлено, что первоначальный титр сохраняется в течение не менее 30 мес. с последующим снижением активности до 10 log₂ через 36 мес. после лиофилизации (рис. 5). Следовательно, сублимационная сушка гипериммунной сыворотки крови кроликов позволяет сохранять высокую активность препарата в течение длительного времени.

ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении работ была получена сыворотка крови кроликов против сибирской язвы с высоким титром антител. Поиск способа изготовления данного лиофилизованного препарата связан с необходимостью применения его в качестве контроля разработанного сибиреязвенного диагностикума. Многими группами исследователей продемонстрирована эффективность использования мышей, морских свинок, коз и лошадей для получения противосибиреязвенных сывороток [16–21]. В нашем эксперименте в качестве модели служили кролики. Это позволило получить большой объем сыворотки по сравнению с мышами или морскими свинками (количество сыворотки от

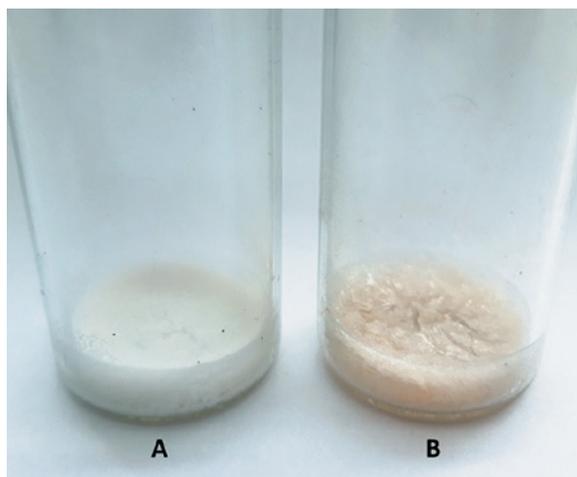


Рис. 4. Визуальная оценка лиофилизированной гипериммунной сыворотки крови: А – режим сублимации № 1; В – режим сублимации № 2

Fig. 4. Visual evaluation of freeze-dried hyperimmune serum: А – freeze-drying mode 1; В – freeze-drying mode 2

одной мыши колеблется в пределах 0,5 мл). Тогда как более крупные животные, например козы и лошади, требуют больших затрат на инфраструктуру для их содержания.

Получение моно- и поликлональных глобулинов и сывороток крови к антигенам *B. anthracis* широко представлено в научной литературе [22–26]. Однако получение поликлональных сывороток к антигенам живых клеток возбудителя сибирской язвы освещается не так широко. В работе M. Caldwell et al. описано получение сыворотки крови лошадей при гипериммунизации штаммом Sterne (pX01+/pX02–) *B. anthracis* [21]. В ходе нашего эксперимента сыворотку также получали на живые бактериальные клетки штамма 55-ВНИИВВиМ (pX01+/pX02–) *B. anthracis*, так как она должна применяться в первую очередь в качестве положительного контроля диагностикума и воспроизводить свойства сывороток иммунизированных животных. Использование живых клеток бактерии штамма 55-ВНИИВВиМ в нашем случае оправданно, поскольку на его основе создаются вакцины против сибирской язвы в России [10]. В недавнем исследовании было показано, что живые вакцины против сибирской язвы обеспечивают формирование напряженного и длительного иммунитета к основным антигенам возбудителя [27].

При иммунизации кроликов клетками штамма 55-ВНИИВВиМ (pX01+/pX02–) *B. anthracis* в опыте были испытаны три схемы гипериммунизации. Лучший синтез антител происходил при внутривенном последовательном введении антигена через каждые 4 дня: при первом введении – 0,5 см³, при втором – 1,0 см³, при третьем – 2,0 см³ с концентрацией 100 млн спор в 1 см³. В результате проведенной гипериммунизации была получена сыворотка крови с уровнем антител, равным 14 log₂, что соответствует титру 1:16384. В аналогичных исследованиях M. Caldwell et al. 12-кратную гипериммунизацию проводили введением лошадям 1,0 см³ спорной вакцины из штамма Sterne *B. anthracis* один раз в месяц, что позволяло получить титр антител на уровне 16,25 log₂ [21]. В своем эксперименте С. D. Kelly et al. иммунизировали коз очищенным rPA (рекомбинантным протективным антигеном *B. anthracis*) с но-

Таблица 3
Физико-химические и биологические показатели лиофилизированной сыворотки крови

Table 3
Physico-chemical and biological parameters of freeze-dried serum

Показатель	Характеристика сыворотки
Внешний вид	Сухая масса в виде таблетки
Цвет	Белого цвета с кремовым оттенком
Растворимость	При добавлении 1 см ³ 0,9%-го раствора NaCl растворяется в течение 1–3 мин
Активность	Агглютинирует антигенный эритроцитарный сибирезвенный диагностикум в разведении 1:16384
Массовая доля влаги, %	2,0

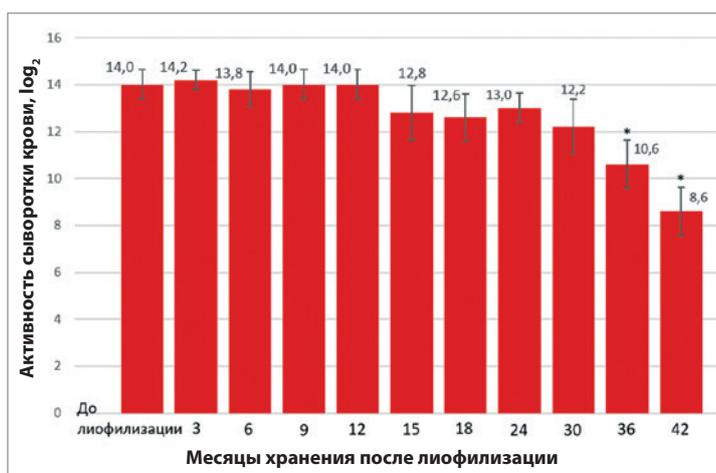


Рис. 5. Активность лиофилизированной гипериммунной сыворотки крови кроликов в процессе длительного хранения при 4 °C (* статистически значимое различие, $p < 0,01$)

Fig. 5. Activity of freeze-dried hyperimmune rabbit serum during long-term storage at 4 °C (* statistically significant difference, $p < 0.01$)

вым мурамилдипептидным адъювантом в дозе 100 мкг конъюгата. Введение антигена проводили на 1, 14, 28 и 56-й день. В результате авторам удалось получить сыворотку крови с титром анти-РА антител, равным 1:16000 [16]. Таким образом, использованная нами схема позволила в более короткий срок получить высокий уровень антител.

Одним из лучших способов консервации и хранения сывороток крови признается лиофилизация [15]. Поэтому для сохранения полученной сыворотки были испытаны два режима сублимационной сушки. Установили, что режим № 1 позволил лиофилировать сыворотку в однородную консистенцию белого цвета с кремовым оттенком, в то время как режим № 2 привел к излишней сухости полученного препарата. В процессе сублимационного высушивания сыворотки крови какие-либо защитные среды не применялись. В работе R. Brogna et al. также продемонстрировано, что лиофилизация сыворотки с протектором и без него не влияют на сохранность иммуноглобулинов [28]. Титр антител в лиофилизированной сыворотке крови сохранялся на исходном уровне в течение 30 мес.

Разработанный способ получения сыворотки крови гипериммунизированных против сибирской язвы кроликов обладает рядом преимуществ (низкая стоимость,

простота производства, высокий титр антител) и представляет собой достойную альтернативу дорогостоящим методам изготовления гипериммунных сывороток крови лошадей. Предлагаемая технология получения сыворотки может быть использована при разработке специфических диагностических препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы разработан способ получения высокоактивной гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки крови кроликов с титром антител, равным $14 \log_2$. Отработан режим лиофилизации полученной сыворотки, позволивший добиться остаточной влажности готового препарата в 2%. Установлено, что длительность хранения лиофилизированной сыворотки крови без потери ее первоначальной активности и физико-химических свойств составляет 30 мес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seid K., Shiferaw A. M., Yesuf N. N., Derso T., Sisay M. Livestock owners' anthrax prevention practices and its associated factors in Sekota Zuria district, Northeast Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 2020; 16 (1):39. DOI: 10.1186/s12917-020-2267-0.
- Иванова С. В., Родионов А. П., Мельникова Л. А. Мониторинг факторов потенциальной опасности возникновения вспышек сибирской язвы. *Иппология и ветеринария.* 2021; 1 (39): 93–100. EDN: RBOFZY.
- Cossaboom C. M., Khaiseb S., Haufiku B., Katjuanjoo P., Kannyinga A., Mbai K., et al. Anthrax epizootic in wildlife, Bwabwata National Park, Namibia, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25 (5): 947–950. DOI: 10.3201/eid2505.180867.
- Muturi M., Gachohi J., Mwatondo A., Lekooloo I., Gakuya F., Bett A., et al. Recurrent anthrax outbreaks in humans, livestock, and wildlife in the same locality, Kenya, 2014–2017. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99 (4): 833–839. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0224.
- Mwakapeje E. R., Høget S., Fyumagwa R., Nonga H. E., Mdegela R. H., Skjerve E. Anthrax outbreaks in the humans – livestock and wildlife interface areas of Northern Tanzania: a retrospective record review 2006–2016. *BMC Public Health.* 2018; 18:106. DOI: 10.1186/s12889-017-5007-z.
- Noordhuizen J., Surborg H., Smulders F. J. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 2013; 33 (3): 161–171. DOI: 10.1080/01652176.2013.826883.
- WAHIS: World Animal Health Information System. Режим доступа: <https://wahis.woah.org>.
- Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Makaev Kh. N., Safina G. M., Murtazina G. Kh., et al. Analysis of the epizootic situation and improvement of the scheme for the specific prevention of anthrax. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2020; 11 (1): 949–952. DOI: 10.26452/ijrps.v11i1.1919.
- Pisarenko S. V., Eremenko E. I., Ryazanova A. G., Kovalev D. A., Buravtseva N. P., Aksenova L. Yu., et al. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol.* 2019; 19:165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.
- Liskova E. A., Egorova I. Y., Selyaninov Y. O., Razheva I. V., Gladkova N. A., Toropova N. N., et al. Reindeer anthrax in the Russian Arctic, 2016: climatic determinants of the outbreak and vaccination effectiveness. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:668420. DOI: 10.3389/fvets.2021.668420.
- Ezhova E., Orlov D., Suhonen E., Kaverin D., Mahura A., Gennadinik V., et al. Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia. *Ecohealth.* 2021; 18 (2): 217–228. DOI: 10.1007/s10393-021-01549-5.
- Иванов А. В., Макаев Х. Н., Мельникова Л. А., Барбарова Л. А., Муртазина Г. Х., Иванова С. В., Хисамутдинов А. Г. Способ получения эритроцитарного сибиреязвенного антигена, способ получения контрольной положительной сыворотки для набора определения антител в сыворотке крови животных, вакцинированных против сибирской язвы, в реакции непрямой гемагглютинации и набор для определения антител. Патент № 2599035 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». № 2015128403/15. Заявл. 13.07.2015. Опубл. 10.10.2016. Бюл. № 28.
- Романов Г. И., Маничев А. А., Саленко Л. С., Степанова В. В., Захаров Д. Г., Комелина Л. И. и др. Способ изготовления сыворотки против сибирской язвы. Патент № 1347224 Российская Федерация. МПК А 61 К39/40. Всеоюзный государственный научно-контрольный институт ветпрепаратов. № 4066843/13. Заявл. 08.05.1986. Опубл. 20.11.1995.

- Баврина А. П. Современные правила применения параметрических и непараметрических критериев в статистическом анализе медико-биологических данных. *Медицинский альманах.* 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZXMBZ.

- Fissore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.

- Kelly C. D., O'Loughlin C., Gelder F. B., Peterson J. W., Sower L. E., Cirino N. M. Rapid generation of an anthrax immunotherapeutic from goats using a novel non-toxic muramyl dipeptide adjuvant. *J. Immune Based Ther. Vaccines.* 2007; 5:11. DOI: 10.1186/1476-8518-5-11.

- Beedham R. J., Turnbull P. C., Williamson E. D. Passive transfer of protection against *Bacillus anthracis* infection in a murine model. *Vaccine.* 2001; 19 (31): 4409–4416. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00197-9.

- Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.* 2002; 70 (2): 544–560. DOI: 10.1128/IAI.70.2.544-550.2002.

- Herrmann J. E., Wang S., Zhang C., Panchal R. G., Bavari S., Lyons C. R., et al. Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine.* 2006; 24 (31–32): 5872–5880. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.065.

- Reuveny S., White M. D., Adar Y. Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., et al. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69 (5): 2888–2893. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.

- Caldwell M., Hathcock T., Brock K. V. Passive protection against anthrax in mice with plasma derived from horses hyper-immunized against *Bacillus anthracis* Sterne strain. *PeerJ.* 2017; 5:e3907. DOI: 10.7717/peerj.3907.

- Plotkin S., Grabenstein J. D. Countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46 (1): 129–136. DOI: 10.1086/523578.

- Kummerfeldt C. E. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug. Resist.* 2014; 7: 101–109. DOI: 10.2147/IDR.S47305.

- Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239 (1): 221–236. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x.

- Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.* 2009; 4 (1): 35–43. DOI: 10.2217/17460913.4.1.35.

- Huang E., Pillai S. K., Bower W. A., Hendricks K. A., Guarnizo J. T., Hoyle J. D., et al. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.* 2015; 13 (6): 365–377. DOI: 10.1089/hs.2015.0032.

- Firstova V. V., Shakhova A. S., Riabko A. K., Silkina M. V., Zeninskaya N. A., Romanenko Y. O., et al. Characterization of the adaptive immune response of donors receiving live anthrax vaccine. *PLoS One.* 2021; 16 (12):e0260202. DOI: 10.1371/journal.pone.0260202.

- Brogna R., Oldenhof H., Sieme H., Figueiredo C., Kerrinnes T., Wolkers W. F. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. *PLoS One.* 2020; 15 (6):e0234502. DOI: 10.1371/journal.pone.0234502.

REFERENCES

- Seid K., Shiferaw A. M., Yesuf N. N., Derso T., Sisay M. Livestock owners' anthrax prevention practices and its associated factors in Sekota Zuria district, Northeast Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 2020; 16 (1):39. DOI: 10.1186/s12917-020-2267-0.
- Ivanova S. V., Rodionov A. P., Melnikova L. A. Monitoring the potential hazards of anthrax outbreaks. *Hippology and veterinary.* 2021; 1 (39): 93–100. EDN: RBOFZY. (in Russ.)
- Cossaboom C. M., Khaiseb S., Haufiku B., Katjuanjoo P., Kannyinga A., Mbai K., et al. Anthrax epizootic in wildlife, Bwabwata National Park, Namibia, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25 (5): 947–950. DOI: 10.3201/eid2505.180867.
- Muturi M., Gachohi J., Mwatondo A., Lekooloo I., Gakuya F., Bett A., et al. Recurrent anthrax outbreaks in humans, livestock, and wildlife in the same locality, Kenya, 2014–2017. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99 (4): 833–839. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0224.
- Mwakapeje E. R., Høget S., Fyumagwa R., Nonga H. E., Mdegela R. H., Skjerve E. Anthrax outbreaks in the humans – livestock and wildlife interface areas of Northern Tanzania: a retrospective record review 2006–2016. *BMC Public Health.* 2018; 18:106. DOI: 10.1186/s12889-017-5007-z.
- Noordhuizen J., Surborg H., Smulders F. J. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 2013; 33 (3): 161–171. DOI: 10.1080/01652176.2013.826883.
- WAHIS: World Animal Health Information System. Available at: <https://wahis.woah.org>.
- Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Makaev Kh. N., Safina G. M., Murtazina G. Kh., et al. Analysis of the epizootic situation and

improvement of the scheme for the specific prevention of anthrax. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2020; 11 (1): 949–952. DOI: 10.26452/ijrps.v11i1.1919.

9. Pisarenko S. V., Eremenko E. I., Ryazanova A. G., Kovalev D. A., Buravtseva N. P., Aksenova L. Yu., et al. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol.* 2019; 19:165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.

10. Liskova E. A., Egorova I. Y., Selyaninov Y. O., Razheva I. V., Gladkova N. A., Toropova N. N., et al. Reindeer anthrax in the Russian Arctic, 2016: climatic determinants of the outbreak and vaccination effectiveness. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8:668420. DOI: 10.3389/fvets.2021.668420.

11. Ezhova E., Orlov D., Suhonen E., Kaverin D., Mahura A., Gennadinik V., et al. Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia. *Ecohealth.* 2021; 18 (2): 217–228. DOI: 10.1007/s10393-021-01549-5.

12. Ivanov A. V., Makaev Kh. N., Melnikova L. A., Barbarova L. A., Murtagina G. Kh., Ivanova S. V., Khisamutdinov A. G. Method of obtaining erythrocyte antigen of anthrax antigen, method of obtaining control positive serum for kit of detection of antibodies in the blood serum of animals vaccinated against anthrax, in the reaction of indirect hemagglutination and kit for detection of antibodies. Patent No. 2599035 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01). FSBSI "FCTRBS-ARRVI". Application: 2015128403/15. Date of filing: 13.07.2015. Date of publication: 10.10.2016. Bull. No. 28. (in Russ.)

13. Romanov G. I., Manichev A. A., Salenko L. S., Stepanova V. V., Zakharov D. G., Komelina L. I., et al. Method for producing serum against anthrax. Patent No. 1347224 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/20. Vsesojuznyj gosudarstvennyj nauchnokontrol'nyj institut vetpreparatov. Application: 4066843/13. Date of filing: 08.05.1986. Date of publication: 20.11.1995. (in Russ.)

14. Bavrina A. P. Modern rules for the use of parametric and nonparametric tools in the statistical analysis of biomedical data. *Medical Almanac.* 2021; 1 (66): 64–73. EDN: IZXMBZ. (in Russ.)

15. Fissore D., McCoy T. Editorial: freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Front. Chem.* 2018; 6:622. DOI: 10.3389/fchem.2018.00622.

16. Kelly C. D., O'Loughlin C., Gelder F. B., Peterson J. W., Sower L. E., Cirino N. M. Rapid generation of an anthrax immunotherapeutic from goats using a novel non-toxic muramyl dipeptide adjuvant. *J. Immune Based Ther. Vaccines.* 2007; 5:11. DOI: 10.1186/1476-8518-5-11.

17. Beedham R. J., Turnbull P. C., Williamson E. D. Passive transfer of protection against *Bacillus anthracis* infection in a murine model. *Vaccine.* 2001; 19 (31): 4409–4416. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00197-9.

18. Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.* 2002; 70 (2): 544–560. DOI: 10.1128/IAI.70.2.544-550.2002.

19. Herrmann J. E., Wang S., Zhang C., Panchal R. G., Bavari S., Lyons C. R., et al. Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine.* 2006; 24 (31–32): 5872–5880. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.065.

20. Reuveny S., White M. D., Adar Y. Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., et al. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69 (5): 2888–2893. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.

21. Caldwell M., Hathcock T., Brock K. V. Passive protection against anthrax in mice with plasma derived from horses hyper-immunized against *Bacillus anthracis* Sterne strain. *PeerJ.* 2017; 5:e3907. DOI: 10.7717/peerj.3907.

22. Plotkin S., Grabenstein J. D. Countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46 (1): 129–136. DOI: 10.1086/523578.

23. Kummerfeldt C. E. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug. Resist.* 2014; 7: 101–109. DOI: 10.2147/IDR.S47305.

24. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239 (1): 221–236. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x.

25. Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.* 2009; 4 (1): 35–43. DOI: 10.2217/17460913.4.1.35.

26. Huang E., Pillai S. K., Bower W. A., Hendricks K. A., Guarnizo J. T., Hoyle J. D., et al. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.* 2015; 13 (6): 365–377. DOI: 10.1089/hs.2015.0032.

27. Firstova V. V., Shakhova A. S., Riabko A. K., Silkina M. V., Zeninskaya N. A., Romanenko Y. O., et al. Characterization of the adaptive immune response of donors receiving live anthrax vaccine. *PLoS One.* 2021; 16 (12): e0260202. DOI: 10.1371/journal.pone.0260202.

28. Brogna R., Oldenhof H., Sieme H., Figueiredo C., Kerrinnes T., Wolkers W. F. Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose. *PLoS One.* 2020; 15 (6): e0234502. DOI: 10.1371/journal.pone.0234502.

Поступила в редакцию / Received 17.02.2023

Поступила после рецензирования / Revised 20.03.2023

Принята к публикации / Accepted 15.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Иванова Светлана Викторовна, кандидат биологических наук, заведующий центром коллективного пользования ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4378-8569>, e-mail: 9274281396@mail.ru.

Мельникова Лилия Арсентьевна, кандидат ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Родионов Александр Павлович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvtspets@gmail.com.

Евстифеев Виталий Валерьевич, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник отделения вирусологических и ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.

Svetlana V. Ivanova, Candidate of Science (Biology), Head of the Center of Collective Use, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4378-8569>, e-mail: 9274281396@mail.ru.

Lilia A. Melnikova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0159-3843>, e-mail: vnivi@mail.ru.

Alexander P. Rodionov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for Collection of Strains of Microorganisms, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0853-5678>, e-mail: alexandrvtspets@gmail.com.

Vitaliy V. Evstifeev, Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Chief Researcher, Department of Virological and Ultrastructural Research, FSBSI "FCTRBS-ARRVI", Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, e-mail: evstifeev@vnivi.ru.