

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-157-163

УДК 616.98:579.852.11:615.371

А.Н. Шевцов, С.А. Пермяков, Н.Г. Хапаев, Р.Ш. Зиганшин

**Новый способ вакцинации против сибирской язвы***Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), Киров, Российская Федерация*

**Цель** исследования – разработка перорального способа вакцинации против сибирской язвы, так как для проведения широких прививочных кампаний с помощью этого метода не требуется специальных условий, оборудования и аппаратуры. Достаточно минимального количества медицинского персонала для обеспечения контроля за приемом препарата. **Материалы и методы.** В работе использовали отечественные сырье, материалы и реактивы, прошедшие входной контроль и отвечающие требованиям ГОСТов, ОСТов, ТУ и статей Государственной фармакопеи РФ. Испытанию подверглись серии сибирезвенной вакцины на основе *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1, приготовленные в НИЦ (г. Киров) ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России. **Результаты и обсуждение.** Отработаны на животных схемы иммунизации исходя из особенностей антигена. Одним из решающих условий, определяющих эффективность пероральной вакцинации, является правильный выбор вида и формы препарата пероральной сибирезвенной вакцины, вводимой энтерально. Показано, что в энтеральных вакцинах, в отличие от оральных, вакцинный штамм должен быть защищен от губительного действия желудочного содержимого. В исследовании использованы кишечнорастворимые капсулы, покрытые оболочкой, устойчивой к действию желудочного сока. Изложенные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что однократное введение капсул с пероральной сибирезвенной вакциной СТИ защищает не менее 70 % лабораторных животных от высоковирулентного штамма сибирезвенного микроба, и подтверждают безвредность и ареактогенность вакцины. Разработанная лабораторная технология позволяет получать готовый препарат, содержащий одну прививочную дозу пероральной вакцины для лабораторных животных. Таким образом, разработан новый способ вакцинации, необходимо проведение доклинических и клинических исследований и скорейшее внедрение в медицинскую практику перорального способа введения сибирезвенной вакцины как наиболее простого для массовой вакцинации людей.

*Ключевые слова:* пероральный способ, иммунизация, эффективная иммунизирующая доза.

*Корреспондирующий автор:* Шевцов Александр Николаевич, e-mail: 23527@mail.ru.

*Для цитирования:* Шевцов А.Н., Пермяков С.А., Хапаев Н.Г., Зиганшин Р.Ш. Новый способ вакцинации против сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 1:157–163. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-157-163

*Поступила 04.10.2022. Отправлена на доработку 24.10.2022. Принята к публ. 09.11.2022.*

A.N. Shevtsov, S.A. Permyakov, N.G. Khapaev, R.Sh. Ziganshin

**New Method of Vaccination Against Anthrax***Affiliated Branch of the “48<sup>th</sup> Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of this work was to develop an oral method of vaccination against anthrax, since wide vaccination campaigns using this method require no special conditions, equipment, and instruments. Also, minimum number of medical personnel is sufficient to ensure control over the intake of the drug. **Materials and methods.** Domestic raw materials, consumables and reagents that passed the incoming inspection and met the requirements of State and industry standards, technical specifications, and the articles of the Pharmacopoeia were used for the work. Batches of anthrax vaccines based on *Bacillus anthracis* strain STI-1, manufactured at the Research Center (Kirov) of the “48<sup>th</sup> Central Research Institute” of the Ministry of Defense of Russia were put to the test. **Results and discussion.** The immunization schemes have been tested on animals, taking into account the features of the antigen. One of the crucial factors that determine the effectiveness of oral vaccination is the correct choice of the type and form of the oral anthrax vaccine administered enterally. It has been shown that in contrast to oral vaccines, the vaccine strain in enteral vaccines must be protected from the harmful effects of stomach contents. Thus, enteric-coated capsules coated with a shell that is resistant to the action of stomach acid were used for the study. The presented experimental data indicate that a single administration of the capsules with oral anthrax vaccine STI protects at least 70 % of laboratory animals from a highly virulent strain of the anthrax microbe and confirm the safety and non-reactogenicity of the drug. The developed laboratory technology makes it possible to obtain a finished product containing one inoculation dose of an oral vaccine for laboratory animals. So, a new method of vaccination has been designed. It is necessary to conduct preclinical and clinical trials to promptly introduce the oral administration of anthrax vaccine into medical practice as the simplest method for mass vaccination of humans.

*Key words:* oral vaccine, immunization, effective immunizing dose.

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

*Corresponding author:* Alexander N. Shevtsov, e-mail: 23527@mail.ru.

*Citation:* Shevtsov A.N., Permyakov S.A., Khapaev N.G., Ziganshin R.Sh. New Method of Vaccination Against Anthrax. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2023; 1:157–163. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-157-163

*Received 04.10.2022. Revised 24.10.2022. Accepted 09.11.2022.*

Shevtsov A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7322-5759>  
Permyakov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2004-4727>

Khapaev N.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9201-9803>  
Ziganshin R.Sh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2197-6358>

Важнейшим направлением борьбы с инфекционными заболеваниями в практической медицине в настоящее время остается иммунопрофилактика, считающаяся наиболее эффективным и экономически выгодным способом [1]. В определенных эпидемических ситуациях, помимо полноты охвата коллектива прививками, определяющим фактором эффективности вакцинопрофилактики является скорость осуществления прививочной кампании. Например, блестящий успех в ликвидации завозной вспышки оспы в Москве в 1960 г. в огромной степени был обусловлен тем, что органам здравоохранения удалось привить практически все население Москвы и Московской области в рекордно короткие сроки [2]. Это свидетельствует о том, что противоэпидемическая практика нуждается в методах иммунизации, которые позволяют быстро привить большие контингенты, обеспечивая ускоренное формирование коллективного иммунитета.

Возможность перорального приема – один из ключевых показателей, предъявляемых ВОЗ к современным препаратам для специфической профилактики инфекционных болезней. Разработка массового, безопасного, неинвазивного способа вакцинации против сибирской язвы является актуальным направлением исследований. В нашей стране разработаны следующие методы массовой иммунизации: при помощи безыгольного инъектора, аэрозольный и пероральный.

**Целью** данного исследования являлась разработка перорального способа вакцинации против сибирской язвы.

В ряде случаев массовая иммунизация исключает возможность проведения прививок в стенах специализированных медицинских учреждений не только в связи с их ограниченной пропускной способностью, но и потому, что необходимость их посещения нарушит ритм жизни коллектива, а в некоторых ситуациях может оказаться попросту нереальной [2]. В связи с этим способы введения вакцинного материала, избираемые для этой цели, должны допускать возможность проведения прививок в приспособленных помещениях либо вообще не предъявлять к месту их осуществления особых требований. Отвлечение персонала медицинской службы на осуществление прививочной кампании, по-видимому, далеко не всегда окажется возможным, кроме того, весьма желательным является также отсутствие необходимости в привлечении к проведению прививок специалистов-медиков высокой квалификации, особенно врачей. Этим требованиям в полной мере соответствует только пероральная иммунизация.

Преимущества пероральной иммунизации как способа массовой профилактики по сравнению с другими способами введения вакцин в организм вполне очевидны. Для проведения широких прививочных кампаний с помощью перорального метода не требуется специальных условий, оборудования и аппаратуры. В данном случае достаточно мини-

мального количества медицинского персонала для обеспечения контроля за приемом вакцинного препарата. Пероральная вакцинация может быть осуществлена не только в медицинских пунктах, но и на дому, в учреждении, на транспорте (теплоход, самолет, поезд), в полевых условиях (на позициях, дежурстве и т.д.). Большое значение для реализации прививок в любых условиях имеет форма препарата пероральной вакцины.

Необходимо отметить, что разработкой пероральных вакцин против сибирской язвы занимаются и за рубежом. Так, в США была проведена оценка иммунной реакции на перорально введенную сельскохозяйственным животным живую энтеральную вакцину на основе штамма 34F2 Sterne [3]. Это исследование имело две цели: разработать модель пероральной вакцины и продемонстрировать продуцирование антител к протективному антигену сибиреязвенного микроба при пероральной вакцинации. В Техасском университете (США) также были проведены исследования и разработана пероральная вакцина для животных на основе ослабленного штамма возбудителя сибирской язвы [4]. Бактерии вакцинного штамма помещали в гелевую оболочку, состоящую из сахаристых веществ водорослей, защищающую клетки от агрессивного воздействия факторов желудочно-кишечного тракта. Полученные результаты показали, что даже при низких и переменных титрах антител по сравнению с подкожной вакцинацией существует потенциальная возможность разработки пероральной живой сибиреязвенной вакцины. Кроме этого, было сообщено о разработке рекомбинантной вакцины перорального введения для специфической профилактики сибирской язвы на основе аттенуированного аденовируса 4-го серотипа – Ad4, синтезирующего рекомбинантный протективный антиген [5].

## Материалы и методы

В работе использовали отечественные сырье, материалы и реактивы, прошедшие входной контроль и отвечающие требованиям ГОСТов, ОСТов, ТУ и статей Государственной фармакопеи РФ [6]. Испытанию подверглись серии сибиреязвенной вакцины на основе *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1, приготовленные в НИЦ (г. Киров) ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России в соответствии с ПР 08461522-26-19 «Промышленный регламент на производство вакцины сибиреязвенной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения» и капсулированные по разработанной технологии. Для оценки иммуногенности использовали штаммы *B. anthracis* 71/12 (вторая вакцина Ценковского) и Ч-7. При выполнении исследований задействовано штатное оборудование и приборы аппаратурно-технологической линии по выпуску сибиреязвенной вакцины согласно спецификации

оборудования, изложенной в ПР 08461522-26-19. Для получения нативной споровой культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 использовали ферментер БИОР-0,1 (г. Кириши), концентрированной споровой суспензии – установку тангенциальной фильтрации АСФ-020 (г. Владимир). Лиофильное высушивание осуществляли на установке АЛСУ-3200 М (г. Йошкар-Ола), капсулирование вакцины осуществляли при помощи капсулятора УКРП-100-МС (Беларусь). Все технологическое оборудование и средства измерения проходили ведомственную поверку с установленной периодичностью. Изучение и оценку биологических и физико-химических характеристик контрольных серий вакцин и их полуфабрикатов проводили в соответствии с требованиями методик по контролю качества (ПР 08461522-26-19 и [6]).

В исследованиях использовались аутбредные морские свинки массой 250–300 г и кролики массой 2,0–2,5 кг, которых содержали в соответствии с нормами и правилами, указанными в [7]. В работе использовались математические и статистические методы исследований [8].

Результаты экспериментальных исследований представлены в виде средних арифметических значений ( $\bar{X}$ ) с определением доверительного интервала при уровне вероятности 95 %.

### Результаты и обсуждение

Конструирование пероральных вакцин основывается на принципах и подходах, учитывающих механизм пероральной иммунизации, характер вакцинального процесса, биологические и физико-химические свойства антигена, анатомо-физиологические особенности пищеварительного тракта [9–11].

Для пероральной иммунизации экспериментально отработана схема введения препарата исходя из особенностей антигена (живая вакцина СТИ), а также зависимости от приема пищи. Лабораторных

животных всегда иммунизировали однократно за 3 часа до приема корма.

При конструировании препарата прежде всего учитывали локализацию «входных ворот» антигена (вакцинного штамма), которыми в нашем случае являлся кишечник, имеющий большую поверхность слизистой оболочки и разветвленную сеть лимфатических узлов. Выбрав энтеральную форму препарата, мы провели исследования по определению времени распадаемости капсул в искусственном желудочном соке, с тем чтобы оценить качество примененного покрытия и получить представление о судьбе препарата при его поступлении в желудок и кишечник.

Для решения этого вопроса проведена серия опытов *in vitro*, в которых определяли устойчивость спор вакцинного штамма к слюне, желудочному соку, желчи и трипсину. При выполнении экспериментов использовали человеческую слюну, коммерческий желудочный сок, желчь и кристаллический трипсин, разведенный в дистиллированной воде. Ввиду того, что слюна содержит большое количество посторонней микрофлоры, оценку количества живых спор вакцинного штамма проводили путем высева на диагностическую среду, которая содержала в качестве питательной основы ферментативный гидролизат казеина, фенолфталеинфосфат натрия и полимиксина сульфат (МУК 4.2.2413-08 «4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы»). Колонии штамма *B. anthracis* СТИ-1 при выращивании на этой среде имели серую окраску, а посторонняя микрофлора – белую, кремовую или ярко-розовую. В ходе экспериментов по 1 мл регидратированной культуры вакцинного штамма смешивали с 4 мл каждой из агрессивных сред. Приготовленные образцы инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 часов. Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Результаты экспериментов (табл. 1) свидетельствовали о том, что только слюна не обладает инактивирующим действием на споры штамма СТИ-1,

Таблица 1 / Table 1

Устойчивость спор вакцинного штамма СТИ-1 к действию секретов желудочно-кишечного тракта ( $\bar{X}$ , n=3)  
Resistance of the vaccine strain STI-1 spores to the effect of gastrointestinal tract secretions ( $\bar{X}$ , n=3)

Секрет (фермент) Secretion (enzyme)	Концентрация живых спор на ... час инкубирования, млрд спор/мл Concentration of live spores per ... hour of incubation, billion spores/ml		Доля инактивации, % Rate of inactivation, %
	0	4	
Слюна Saliva	1,0	1,0	0,0
Коммерческий желудочный сок Commercial gastric acid	0,9	0,4	55,5
Раствор трипсина Trypsin solution	1,1	0,5	54,5
Желчь Bile	1,0	0,6	40,0

Примечание: n – количество опытов.

Note: n – number of experiments.

тогда как все остальные вещества существенно снижают их биологическую концентрацию. Тактику пероральной иммунизации при сибиреязвенной инфекции строили с учетом способности вакцинного штамма при введении в желудочно-кишечный тракт противостоять имеющимся там неблагоприятным условиям, сохраняя свою антигенность и способность проникать за пределы этого тракта, размножаться и достигать иммунокомпетентных тканей и клеток [9, 12]. Желудочно-кишечный тракт имеет мощные защитные барьеры, к которым относятся плотный эпителиальный покров (механическая защита), секреция ферментов, соляной кислоты, желчи (физико-химическая защита), скопление лимфоидной ткани и клеточных элементов по ходу и в стенке кишечника (иммунологическая защита) [12]. Именно этим объясняется тот факт, что для эффективной пероральной иммунизации необходима гораздо большая иммунизирующая доза вакцины [5].

Оценку эффективности пероральной вакцинации против сибирской язвы первоначально проводили в опытах на морских свинках (20 животных на каждую дозу), в пищевод которых затруднительно ввести капсулы даже самого меньшего размера. Поэтому лабораторным животным перорально вводили в пищевод с помощью шприца со специальной насадкой различные дозы регидратированной живой сибиреязвенной вакцины СТИ. Первой контрольной группе животных вакцину вводили подкожно в дозе 50 млн спор (одна человеко-доза), а второй контрольной группе вакцину не вводили. На 21-е сутки после иммунизации всех животных заражали тест-штабмом *B. anthracis* 71/12 (вторая вакцина Ценковского) в дозе 30 ЛД<sub>50</sub>. За животными наблюдали в течение 10 дней. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствовали о том, что пероральное введение регидратированной живой сибиреязвенной вакцины СТИ (в дозах  $100 \cdot 10^6$  и  $500 \cdot 10^6$  спор) защищало от гибели не

менее 6 и 15 % морских свинок соответственно. Все животные второй контрольной группы погибли на 4–5-е сутки, а доля выживших животных, вакцинированных подкожно (первая контрольная группа), составила не менее 70 %. Эти результаты полностью согласуются с данными ряда авторов, показавших, что доза антигена в пероральном препарате должна быть значительно выше, чем в аналогичных препаратах для парентерального применения [5, 9, 10].

Дальнейшие исследования были направлены на определение эффективной пероральной иммунизирующей дозы для лабораторных животных. Вакцинацию и заражение морских свинок проводили так же, как в предыдущем эксперименте (20 животных на каждую дозу). Дозу вводимой вакцины определяли высевом на чашки Петри. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Из результатов табл. 3 следует, что регидратированная живая сибиреязвенная вакцина, введенная перорально в дозе 12 млрд живых спор, защищает от гибели не менее 78 % животных. Во всех дальнейших исследованиях эффективная иммунизирующая доза регидратированной живой сибиреязвенной вакцины СТИ определялась высевом на чашки Петри. Таким образом, определена эффективная иммунизирующая доза регидратированной живой сибиреязвенной вакцины СТИ для морских свинок, равная 12 млрд живых спор, обеспечивающая защиту лабораторных животных на уровне подкожной иммунизации. Исходя из полученных результатов, можно констатировать, что пероральная доза живой сибиреязвенной вакцины СТИ должна быть не менее чем в 200 раз больше подкожной дозы.

На основании экспериментально-теоретических исследований сделан вывод о том, что наиболее приемлемой лекарственной формой для получения энтеральной сибиреязвенной вакцины являются капсулы, которые представляют собой современный вид упаковки порошков. Капсулы – дозированные лекарственные формы, представляющие собой оболочку,

Таблица 2 / Table 2

Эффективность пероральной иммунизации морских свинок споровой суспензией штамма *B. anthracis* СТИ-1 (n=5)The effectiveness of oral immunization of guinea pigs with a spore suspension of the strain *B. anthracis* STI-1 (n=5)

Иммунизирующая доза, спор Immunizing dose, spores	Способ введения Route of administration	Доля выживших животных, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), % Proportion of surviving animals, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), %
50·10 <sup>6</sup> по БК 50·10 <sup>6</sup> according to BC	Перорально Orally	0
100·10 <sup>6</sup> по БК 100·10 <sup>6</sup> according to BC	Перорально Orally	8±2
500·10 <sup>6</sup> по БК 500·10 <sup>6</sup> according to BC	Перорально Orally	17±2
Контроль 1 (50·10 <sup>6</sup> ) по ОК Control 1 (50·10 <sup>6</sup> ) according to TC	Подкожно Subcutaneously	72±2
Контроль 2 Control 2	Не вводили No inoculation	0

Примечание: ОК – общая концентрация спор; БК – биологическая концентрация спор; n – количество опытов.

Note: TC – total concentration of spores; BC – biological concentration of spores; n – number of experiments.

Таблица 3 / Table 3

**Определение эффективной иммунизирующей дозы при пероральной вакцинации морских свинок суспензией спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 (n=5)**

**Determination of an effective immunizing dose for oral vaccination of guinea pigs with a spore suspension of the strain *B. anthracis* STI-1 (n=5)**

Иммунизирующая доза, спор Immunizing dose, spores	Способ введения Route of administration	Доля выживших животных, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), % Proportion of surviving animals, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), %	Среднее время гибели, сутки Average time of death, day
2,0·10 <sup>9</sup> по БК 2,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	35,0±2,0	3,5
5,5·10 <sup>9</sup> по БК 5,5·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	40,0±3,0	4,0
8,0·10 <sup>9</sup> по БК 8,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	75,0±3,0	4,5
10,8·10 <sup>9</sup> по БК 10,8·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	75,0±3,0	5,8
12,0·10 <sup>9</sup> по БК 12,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	80,0±2,0	6,0
50,0·10 <sup>6</sup> по ОК 50,0·10 <sup>6</sup> according to TC	Подкожно Subcutaneously	75,0±3,0	4,7
Контроль Control	Не вводили No inoculation	0	3,5

Примечание: ОК – общая концентрация спор; БК – биологическая концентрация спор; n – количество опытов.

Note: TC – total concentration of spores; BC – biological concentration of spores; n – number of experiments.

в основном из желатина, заполненную вакцинным препаратом в количестве, равном индивидуальной дозе, которые имеют несколько преимуществ (маскируют неприятный вкус, запах, позволяют порошкам одновременно быть в компактной, но не спрессованной форме и т.д.). Российская промышленность выпускает твердые желатиновые капсулы разных стандартных типоразмеров.

В дальнейших исследованиях нами использованы кишечнорастворимые капсулы, покрытые оболочкой, устойчивой к действию желудочного сока, или полученные с использованием веществ, устойчивых к воздействию желудочного сока. В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что именно капсулы размером 0 вмещают необходимый объем вакцины СТИ, содержащий 8–12 млрд живых спор.

Отработанный нами процесс капсулирования лиофилизированной сибиреязвенной вакцины СТИ включал следующие стадии:

- подготовительная (подготовка рабочего места, расчеты, оформление технологической документации);

- приготовление лиофилизированного порошка;
- расфасовка порошка в капсулы;
- упаковка, маркировка;
- контроль качества готовой продукции.

Капсулы укладывали во флаконы из полиэтиленерефталата. Контроль качества проводили в соответствии с [6].

Дальнейшие исследования были направлены на уточнение данных по определению эффективной иммунизирующей дозы капсулированной вакцины, так как морским свинкам практически невозможно ввести вакцину, заключенную в капсулы, из-за малого

диаметра их пищевода. В качестве наиболее подходящей лабораторной модели выбраны кролики (по 20 животных на каждую дозу). Животных вакцинировали перорально разными дозами вакцины, заключенной в твердые желатиновые кишечнорастворимые капсулы. В качестве положительного контроля использовали кроликов, вакцинированных подкожно вакциной СТИ в дозе 50 млн спор. Отрицательным контролем служили животные, которым вакцина не вводилась. Через 21 сутки после вакцинации всех животных заражали подкожно культурой высоковирулентного тест-штамма *B. anthracis* Ч-7 в дозе 30 ЛД<sub>50</sub>. Результаты этих исследований представлены в табл. 4.

Из полученных результатов (табл. 4) следует, что пероральная иммунизация капсулированной вакциной СТИ в дозах 8–12 млрд живых спор не уступает по своей эффективности подкожной иммунизации в дозе 50 млн, что соответствует медико-биологическим требованиям, которые декларируют, что у вакцинированных животных препарат должен обеспечивать защитный эффект не менее чем у 70 % животных [11]. Среднее время гибели лабораторных животных, за которое погибает 50 % животных после заражения их высоковирулентным тест-штаммом *B. anthracis* Ч-7, при пероральной вакцинации было практически таким же, как и при подкожной вакцинации.

Дальнейшие исследования были направлены на подтверждение полученных данных об эффективной пероральной иммунизирующей дозе живой сибиреязвенной вакцины СТИ, помещенной в капсулы.

Кроликов (20 животных) иммунизировали перорально тремя сериями вакцины, заключенной в твердые желатиновые кишечнорастворимые капсулы.

Таблица 4 / Table 4

**Определение эффективной иммунизирующей дозы при пероральной вакцинации кроликов суспензией спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 ( $\bar{X}$ , n=3)**

**Determination of an effective immunizing dose for oral vaccination of rabbits with a spore suspension of the strain *B. anthracis* STI-1 ( $\bar{X}$ , n=3)**

Иммунизирующая доза, спор Immunizing dose, spores	Способ введения Route of administration	Доля выживших животных, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), % Proportion of surviving animals, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), %	Среднее время гибели, сутки Average time of death, day
3,0·10 <sup>9</sup> по БК 3,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	40,0±2,0	5,0
6,0·10 <sup>9</sup> по БК 6,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	65,0±4,0	5,0
8,0·10 <sup>9</sup> по БК 8,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	75,0±2,0	4,8
12,0·10 <sup>9</sup> по БК 12,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	80,0±4,0	5,3
50·10 <sup>6</sup> по ОК 50·10 <sup>6</sup> according to TC	Подкожно Subcutaneously	75,0±2,0	4,8
Контроль Control	Не вводили No inoculation	0	3,1

Примечание: ОК – общая концентрация спор; БК – биологическая концентрация спор; n – количество опытов.

Note: TC – total concentration of spores; BC – biological concentration of spores; n – number of experiments.

В качестве положительного контроля использовали животных, вакцинированных подкожно вакциной СТИ в дозе 50 млн спор. Отрицательным контролем служили невакцинированные животные. Через 21 сутки после вакцинации всех животных заражали подкожно культурой высоковирулентного тест-штамма *B. anthracis* Ч-7 в дозе 30 ЛД<sub>50</sub>. Результаты проведенных исследований (табл. 5) показали, что пероральная иммунизация капсулированной вакциной СТИ в дозах 8–12 млрд живых спор не уступает по своей эффективности подкожной иммунизации в дозе 50 млн спор и защищает не менее 72 процентов лабораторных животных.

Заключительные исследования посвящены изучению специфической безопасности живой сибиреязвенной вакцины СТИ для перорального применения, которое проводили на кроликах. С этой целью четырех кроликов перед введением препарата термометрировали и взвешивали ежедневно в течение 3 суток и за 30 минут до анализа (нулевая проба). Затем двум животным шприцем подкожно в область внутренней поверхности бедра вводили по 250 млн спор вакцины. Одновременно с подкожным введением препарата проводилось пероральное введение вакцины в дозе 11,4 млрд живых спор двум другим кроликам. Наблюдение за всеми животными

Таблица 5 / Table 5

**Оценка иммуногенности вакцины живой сибиреязвенной СТИ для перорального применения (n=3)**

Evaluation of the immunogenicity of the live anthrax vaccine STI for oral administration (n=3)

Препарат Drug	Вакцинирующая доза, спор Vaccination dose, spores	Способ введения Route of administration	Доля выживших животных, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), % Proportion of surviving animals, ( $\bar{X} \pm I_{95}$ ), %
Вакцина живая сибиреязвенная СТИ для перорального применения (серия № 1) Live anthrax vaccine STI for oral administration (series 1)	12,2·10 <sup>9</sup> по БК 12,2·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	80,0±2,0
Вакцина живая сибиреязвенная СТИ для перорального применения (серия № 2) Live anthrax vaccine STI for oral administration (series 2)	11,4·10 <sup>9</sup> по БК 11,4·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	75,0±3,0
Вакцина живая сибиреязвенная СТИ для перорального применения (серия № 3) Live anthrax vaccine STI for oral administration (series 3)	8,0·10 <sup>9</sup> по БК 8,0·10 <sup>9</sup> according to BC	Перорально Orally	75,0±2,0
Вакцина живая сибиреязвенная СТИ Live anthrax vaccine STI	50,0·10 <sup>6</sup> по ОК 50,0·10 <sup>6</sup> according to TC	Подкожно Subcutaneously	75,0±2,0
Контроль Control	0	Не вводили No inoculation	0

Примечание: ОК – общая концентрация спор; БК – биологическая концентрация спор; n – количество опытов.

Note: TC – total concentration of spores; BC – biological concentration of spores; n – number of experiments.

ми вели в течение 10 суток, ежедневно контролируя температуру и массу тела животных. По окончании срока наблюдения все кролики были здоровы, снижения массы тела не отмечалось. Повышение температуры тела в течение 2 суток после введения препаратов не превышало 1 °С. Результаты проведенных исследований показали, что пероральное введение сибиреязвенной вакцины СТИ в дозе, превышающей более чем в 200 раз подкожную дозу, безвредно для лабораторных животных.

На впервые разработанный пероральный способ вакцинопрофилактики сибирской язвы в 2020 г. получен патент на изобретение [13].

Таким образом, разработан метод пероральной иммунизации, которая является самым физиологичным и массовым способом приобретения специфической устойчивости к сибиреязвенной инфекции. Требуется дальнейшие исследования в плане тактики применения и уточнения доз для человека.

При конструировании препарата сибиреязвенной вакцины прежде всего учитывали локализацию «входных ворот» вакцинного штамма – тонкий отдел кишечника. Основные исследования были направлены на поиск эффективной пероральной иммунизирующей дозы живой сибиреязвенной вакцины СТИ, помещенной в капсулы. Результаты изучения пероральной иммунизации на лабораторных животных показали ее высокую эффективность при сибиреязвенной инфекции. Впервые экспериментально показано, что пероральная доза сибиреязвенной вакцины, равная 8–12 млрд живых спор, обеспечивает защиту не менее 70 % лабораторных животных, зараженных тест-штаммами сибиреязвенного микроба в дозе 30 ЛД<sub>50</sub>. Разработанная лабораторная технология приготовления вакцины позволяет получать готовый препарат в виде кишечнорастворимых капсул, содержащих одну прививочную дозу пероральной вакцины для кроликов.

Изучение специфической безопасности позволило заключить, что она находится на уровне подкожного способа введения вакцинного препарата.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### Список литературы

1. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Гайдерова С.Л., Лысикова С.Л., Медуницын Н.В. Иммуный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020; 20(1):21–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-1-21-29.
2. Воробьев А.А., Лебединский В.А. Массовые способы иммунизации. М.: Медицина; 1977. 255 с.
3. Shakya K.P., Huqh-Jones M.E., Elzer Ph.H. Evaluation of immune response to orally administered Sterne strain 34F2 anthrax vaccine. *Vaccine*. 2007; 25(29):5374–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.05.003.
4. Benn Felix J., Chaki S.P., Xu Y., Ficht T.A., Rice-Ficht A.C., Cook W.E. Protective antibody response following oral vaccination with microencapsulated *Bacillus anthracis* Sterne strain 34F2 spores. *NPJ Vaccines*. 2020; 5:59. DOI: 10.1038/s41541-020-0208-3.
5. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кутырев В.В. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 4:112–26. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-112-126.

6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Ч. 2. М.; 2021.
7. Белозерцева И.В., Блинов Д.В., Красильщикова М.С., редакторы. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных: пер. с англ. Изд. 8. М.: ИРБИС; 2017. 304 с.
8. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. 10.4. Проверка гипотез о равенстве долей признака в двух и более совокупностях. М.; 2004. С. 360–3.
9. Воробьев А.А. Теоретические и практические аспекты проблемы пероральной иммунизации на современном этапе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1973; 7:3–15.
10. Мешалова А.Н. Теоретические основы и принципы конструирования энтеральных вакцин. М.: Медицина; 1974. 199 с.
11. Онищенко Г.Г., Дармов И.В., Борисевич С.В., редакторы. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки внедрения медицинских средств защиты. Сергиев Посад; 2018. 592 с.
12. Покровский В.М., Коротко Г.Ф., редакторы. Физиология человека. М.: Медицина; 2003.
13. Шевцов А.Н., Пермяков С.А., Кузнецовский А.В., Коротышев О.В., Бирюков В.В., Боровской Д.В. Пероральный способ вакцинопрофилактики сибирской язвы. Патент РФ № 2712133, опублик. 24.01.2020. Бюл. № 3.

#### References

1. Alpatova N.A., Avdeeva Z.I., Gayderova L.A., Lysikova S.L., Medunitsyn N.V. [Immune response induced by immunisation with antiviral vaccines]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2020; 20(1):21–9. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-1-21-29.
2. Vorob'ev A.A., Lebedinsky V.A. Methods of Mass Immunization. Moscow: "Medicine"; 1977. 255 p.
3. Shakya K.P., Huqh-Jones M.E., Elzer Ph.H. Evaluation of immune response to orally administered Sterne strain 34F2 anthrax vaccine. *Vaccine*. 2007; 25(29):5374–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.05.003.
4. Benn Felix J., Chaki S.P., Xu Y., Ficht T.A., Rice-Ficht A.C., Cook W.E. Protective antibody response following oral vaccination with microencapsulated *Bacillus anthracis* Sterne strain 34F2 spores. *NPJ Vaccines*. 2020; 5:59. DOI: 10.1038/s41541-020-0208-3.
5. Mikshis N.I., Popova P.Yu., Semakova A.P., Kutyrev V.V. [Licensed anthrax vaccines and experimental drugs at the stage of clinical trials]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; (4):112–26. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-112-126.
6. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Part 2. Moscow; 2021.
7. Belozertseva I.V., Blinov D.A., Krasil'shchikova M.S., editors. [Guidelines on the Maintenance and Use of Laboratory Animals]. Translated from English. Eighth Edition. Moscow: IRBIS; 2017. 304 p.
8. Kremer N.Sh. [Theory of Probability and Mathematical Statistics. 10.4. Verification of Hypotheses about the Equality of the Feature Shares in Two or More Populations]. Moscow; 2004. P. 360–3.
9. Vorob'ev A.A. [Theoretical and practical aspects of the problem of oral immunization at the present stage]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1973; (7):3–15.
10. Meshalova A.N. [Theoretical Foundations and Principles of Design of Enteral Vaccines]. Moscow: "Medicine"; 1974. 199 p.
11. Onishchenko G.G., Darmov I.V., Borisevich S.V., editors. [Anthrax: Topical Issues of Development, Implementation of Medical Remedies]. Sergiev Possad; 2018. 592 p.
12. Pokrovsky V.M., Korot'ko G.F., editors. [Human Physiology]. Moscow: "Medicine"; 2003.
13. Shevtsov A.N., Permyakov S.A., Kuznetsovsky A.V., Korotyshev O.V., Biryukov V.V., Borovskoy D.V. [Oral method of preventive vaccination against anthrax]. RF Patent No. 2712133, publ. Jan 24, 2020. Bulletin No. 3.

#### Authors:

Shevtsov A.N., Permyakov S.A., Khapaev N.G., Ziganshin R.Sh. Affiliated Branch of the "48<sup>th</sup> Central Research Institute" of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

#### Об авторах:

Шевцов А.Н., Пермяков С.А., Хапаев Н.Г., Зиганшин Р.Ш. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). Российская Федерация, 610000, Киров, Октябрьский пр-т, 119. E-mail: 23527@mil.ru.