

УДК: 615.371: 579.841.95Francisella-07

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ РАЗНЫХ ЛЕТ ХРАНЕНИЯ

Е.А. Соловьев¹, Л.В. Саяпина¹, А.А. Горяев¹, Н.А. Осина²,
М.П. Рудник¹, Д.С. Давыдов¹, В.П. Бондарев¹

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Минздрава России, Москва

² ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Выявлена вариабельность культурально-морфологических, биохимических, генетических и иммунобиологических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 гг. высушивания, хранящегося в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Показана необходимость постоянного поддержания стабильности штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ при хранении.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, основные свойства, стабильность.

STUDY OF FRANCISELLA TULARENSIS NIEG-15 VACCINE STRAIN STABILITY AFTER DIFFERENT STORAGE PERIODS

E.A. Solovyev¹, L.V. Sayapina¹, A.A. Goryaev¹, N.A. Osina², M.P. Rudnik¹, D.S. Davydov¹,
V.P. Bondarev¹

¹Scientific Center on expertise of medical application products of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow

²Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

Variability of cultural, morphological, biochemical, genetic and immunobiological properties of *Francisella tularensis* 15 NIEG strains dried in 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003 and 2012 and stored in a National collection of pathogenic bacteria (Russia) was detected. These data confirmed the need for a continuing study to maintain the stability of the *F. tularensis* 15 NIEG strain.

Key words: *Francisella tularensis* NIEG-15 vaccine strain, phenotypic properties, stability.

В России для профилактики туляремии применяется вакцина туляремиальная живая на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученного путем 10 кратного пассирования на морских свинках культуры штамма *F. tularensis* № 15-восстановленного. История создания штамма *F. tularensis* № 15 уходит в 40-е годы прошлого столетия, когда Н.А. Гайский, используя метод аттенуации туляремиального микроба на искусственных питательных средах, получил 2 штамма *F. tularensis* № 15 и Ондатра IV, в качестве кандидатов в вакцинные. Однако в ходе дальнейших исследований установлено, что более устойчивым при хранении оказался только штамм *F. tularensis* № 15, который и был рекомендован для производства туляремиальной вакцины. Указанный штамм на протяжении многих лет применяется для изготовления живой туляремиальной вакцины, при этом трижды (1954, 1962, 2003 гг.) де-факто подвергался восстановлению иммуногенных свойств [1, 2, 3].

Цель работы – изучение стабильности культурально-морфологических, биохимических, генетических и иммунобиологических свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранящегося в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Материалы и методы

В работе с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и иммунобиологических методов было изучено 7 штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003 и 2012 гг. высушивания, хранящихся при температуре от минус (17±1) до (22±2) °С.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что по внешнему виду штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ в ампулах имели вид пористой массы, беловато-кремового цвета. Сравнительное изучение культурально-морфологических свойств 7 штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ показало, что на FT-агаре с 5 % дефибринированной кроличьей кровью и без крови после инкубирования при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 сут все штаммы вырастали в виде беловато-серых, блестящих, круглых колоний. При этом отмечено, что на FT-агаре с кровью колонии были более однородные диаметром от 1 до 2,5 мм, без крови – от 1 до 3 мм. В мазках, окрашенных по Граму, культура штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ представляла собой полиморфные, неподвижные, грамотрицательные коккобактерии.

При определении степени диссоциации туляремиального микроба установлено, что штаммы 1953, 1966, 1969, 2003 и 2012 гг. высушивания по содержанию иммуногенных SR-колоний соответствовали требованиям нормативной документации и имели в своем составе от 87 до 99 % иммуногенных колоний (норма не менее 80 %). В то же время штамм 1987 г., выращенный на обеих питательных средах, содержал пониженное количество SR-колоний (70-75 %); штамм 1990 г. высушивания на FT-агаре с 5 % содержанием крови имел в своем составе 82 %, а без крови – всего 68 % SR-колоний, что подтверждает нестабильность свойств вакцинного штамма.

Биохимические свойства штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ изучали на среде Dawns. Выявлено, что все штаммы имели типичные для голарктического подвида свойства, ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, маннозу с разной степенью активности и не ферментировали глицерин. Все штаммы образовывали сероводород и не образовывали индол. Наиболее активными были штаммы 1953 и 1966 гг. высушивания, так как при ферментации сахаров наблюдалось типичное желтое окрашивание среды. При посеве штаммов других годов высушивания среда Dawns приобретала желтовато-зеленый цвет. Выявлена существенная вариабельность спектра ферментативной активности штаммов, изучаемых с помощью коммерческих тест-систем.

Изучение стабильности штаммов по генетическим свойствам показало, что туляремиальные штаммы имеют практически одинаковые RAPD-профили. Вариабельность, касающаяся единичных фрагментов ДНК, свидетельствует о возможных изменениях генетических свойств штаммов в процессе их хранения. По серологической активности все штаммы были одинаковы – агглютинировались туляремиальной сывороткой в разведении 1:1600, что было ниже установленной нормы (1:3200).

Остаточная вирулентность туляремиальных штаммов была изучена на белых мышах, которым подкожно вводили дозы от 5 до 5×10^6 м.к./мл. За животными наблюдали в течение 21 сут. Павших животных вскрывали. В ходе вскрытия были выявлены типичные для туляремии изменения внутренних органов (инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение печени и селезенки). При высеве селезенки на плотную питательную среду у всех животных была выделена культура туляремиального микроба. Штаммы 1953, 1969, 1987, 1990, 2003 и 2012 гг. имели сходную степень остаточной вирулентности (от 100 до 250 м.к.). В то же время штамм 1966 г. высушивания примерно в 3000 раз уступал другим по этому показателю, при этом значение показателя находилось в пределах нормы (от 100 до 1×10^6 м.к.). Патоморфологические изменения в органах животных по сравнению с другими штаммами были менее выражены.

Безвредность штаммов исследовали путем введения морским свинкам подкожно дозы 5×10^9 м.к./мл, с последующим наблюдением за ними в течение 15 сут. У всех морских свинок на месте введения отмечался некроз тканей, при этом 6 штаммов были безопасными для животных. Введение штамма 1987 г. высушивания привело на 11 сут к гибели морской свинки.

Важным этапом при изучении протективных свойств является определение прививаемости штамма, выражающейся прививочной реакцией у морских свинок в виде появления через 2-5 сут на месте введения вокруг насечек инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм. Все штаммы имели умеренно выраженную реакцию (от 5 до 10 мм), развивающуюся при накожном введении доз 5×10^6 и 5×10^7 м.к./мл.

Ретроспективный анализ паспортов и протоколов ежегодного изучения туляремиальных штаммов показал, что по данному показателю иммуногенность штаммов составляла от 25 до 200 м.к. (норма не более 1000 м.к.). Экспериментальным путем определяли иммуногенность штамма 2012 г. высушивания. ЕД₅₀ штамма для иммунизированных подкожно морских свинок против их заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 дозой 1000 DCL (dosis certa letalis) составила 158,5 м.к., что указывает на наличие ярко выраженной его иммуногенной активности.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о вариабельности основных свойств лиофилизированных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ при хранении, что обуславливает значимость его постоянного изучения, а при необходимости и коррекцию иммуногенных свойств.

Литература

1. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2 (51). – С. 17-22.
2. Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С., Угловой Г.П., и др. Сравнительные испытания на людях вариантов вакцинного туляремийного штамма 15 Гайского // Журн. микробиол. и иммунобиол. – 1971. – № 5. – С. 55-57.
3. Профилактика туляремии. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7.2642-10 // Бюлл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. – 2010. – Вып. 3. – С. 15-35.

Ответственный автор

Саяпина Лидия Васильевна – Главный эксперт ФГУБ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России докт. мед. наук/
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.841.93Brucella-07

ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BRUCELLA SPP.*

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, С.И. Головнева, Е.В. Чеботарева
*ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора, Ставрополь*

Разработан проект пополняемой электронной базы данных масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, США). На основании анализа репрезентативных масс-спектров 39 штаммов бруцелл выявлены 12 возможных родоспецифичных фрагментов в диапазоне масс 2000 – 20000 Да.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза.

APPLICATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY TO BRUCELLA SPP. IDENTIFICATION

D.V. Ulshina, D.A. Kovalev, S.I. Golovneva, E.V. Chebotareva
Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

The project of refillable electronic database of mass spectrometric protein profiles of brucellosis strains in the environment of the program MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, USA) has been developed. On the basis of analysis of representative mass spectra of 39 Brucella strains, 12 possible genus-specific fragments in the mass range 2000 - 20000 Da were identified.

Key words: mass spectrometry, protein profiling, brucellosis causative agent.

Одним из перспективных современных методов идентификации и дифференциации бактерий является времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей отдельных микроорганизмов [1]. Исходя из возможных угроз здоровью населения, актуальной задачей является разработка эффективного стандартизированного метода экспресс-идентификации возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF MS.

Основными преимуществами использования MALDI-TOF масс-спектрометрии по сравнению с