

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Методические рекомендации
«Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок
обращения»

Методические рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к утверждению на заседании секции № 3 Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 5 от 01 октября 2021 г.)

Методические рекомендации утверждены и введены в действие приказом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 392 от 15.11.2021 г.

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП, д-р мед. наук	01.09.2021	Л.В. Саяпина
Исполнители: И.о генерального директора, канд. фарм. наук	01.09.2021	В.В. Косенко
Заместитель генерального директора по экспертизе ЛС, д-р мед. наук, проф.	01.09.2021	В.А. Меркулов
Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, проф.	01.09.2021	В.П. Бондарев
Начальник управления экспертизы противобактериальных МИБП	01.09.2021	Ю.И. Обухов
Заместитель начальника управления экспертизы противобактериальных МИБП, канд. фарм. наук	01.09.2021	М.А. Кривых
Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов, канд. биол. наук	01.09.2021	Д.С. Давыдов
Директор центра подтверждения соответствия качества лекарственных средств		Е.А. Соловьев

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	743
ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	745
ВВЕДЕНИЕ.....	747
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	748
1 Порядок изучения, изготовления, хранения и поддержания вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	748
2 Требования к вакцинному штамму <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	749
3 Условия работы с вакцинным штаммом <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	753
4 Требования к персоналу.....	753
5 Место хранения и передачи вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	753
6 Изготовление вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	756
7 Изучение вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ после лиофилизации.....	758
8 Поддержание вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ в течение срока годности, хранение и транспортирование.....	772
9 Требования безопасности.....	773
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	774
Приложение 1 Паспорт вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	775
Приложение 2 Питательные среды, используемые при изготовлении и контроле вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	776
Приложение 3 Оборудование, реактивы и материалы.....	779
Приложение 4 Требования и изготовление тест-штамма <i>F. tularensis</i> 503/840, используемого для контроля иммуногенности вакцины туляремийной живой и вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ.....	782

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

– Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. Федеральных законов с изменениями и дополнениями).

– Методические указания МУ 3.3.2.1081-01 «Порядок государственного надзора за качеством медицинских иммунобиологических препаратов».

– Приказ Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916 «Правила надлежащей производственной практики».

– Методические указания МУ 3.3.1.2116-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба».

– Методические указания МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией».

– Методические указания МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептикозных бактерий».

– Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ).

– Федеральный закон РФ от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации».

– Постановление Правительства РФ от 19.03.2019 № 284 «О внесении изменений в Положение о Правительственной комиссии по вопросам биологической и химической безопасности Российской Федерации».

– СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

– WHO «Improving public health preparedness for and response to the threat of epidemics: tularaemia network». - WHO/CDS/CSR/LYO/2004.6. (Report of a WHO *meeting* Bath, United Kingdom, 14–15 September 2003.- Department of Communicable Disease Surveillance and Response).

– WHO «Epidemic and pandemic alert and response» Guidelines on Tularaemia. - WHO/CDS/EPR/2007.7.

– WHO Guidelines «Infection prevention and control of epidemic-and pandemic prone acute respiratory infections in health care» – World Health Organization, 2014.

– WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization. Geneva. 2007.

– De La Puente-Redondo V.A., Del Blanco N.G., Gutierrez C.B. et al. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1016-22.

– Kojima K., Bennett A., Blacksell S., Heisz M., Makison Booth C., McKinney M., Summermatter K. Laboratory Biosafety Manual. [Руководство по биобезопасности в лаборатории. 4-е изд.]. Geneva: World Health Organization, 2020.

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Эталонная линия вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ	–	штамм, соответствующий по фенотипическим и генетическим свойствам штамму при его происхождении, официально депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности и являющийся основой производственной посевной культуры
Производственная линия вакцинного штамма <i>Francisella</i> <i>tularensis</i> 15 НИИЭГ	–	очередная серия, полученная из эталонной линии вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ, соответствующая ему по фенотипическим и генетическим свойствам и используемая для получения производственной посевной культуры при изготовлении иммунобиологических лекарственных препаратов
Уполномоченное учреждение	–	учреждение, на которое в установленном порядке, возложены полномочия изучения, хранения и поддержания эталонного вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ
GMP	–	надлежащая производственная практика
м.к.	–	микробные клетки
РА	–	реакция агглютинации
ЛПС	–	липополисахарид
МЕ	–	международные единицы
СО	–	стандартный образец
ФСО	–	отраслевой стандартный образец мутности бактериальных взвесей, равной 10 МЕ (международные единицы), соответствующий 5×10^9 м.к./мл туляремийного микроба

	Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности
ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России	– Государственная коллекция патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
ПБА	– патогенные биологические агенты
СИБ	– Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов
ED ₅₀	– средняя эффективная доза вакцинного штамма, обеспечивающая защиту 50 % иммунизированных животных от инфицирования вирулентным штаммом
LD ₅₀	– средняя смертельная доза туляремиального микроба, вызывающая гибель 50% инфицированных животных
Dcl	– смертельная доза, вызывающая гибель 100 % инфицированных животных
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– Дезоксинуклеозидтрифосфаты
п.н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ТАЕ	– Трис-ацетатный буфер
RAPD	– Random Amplified Polymorphic DNA (ПЦР со случайными праймерами)

ВВЕДЕНИЕ

Для специфической профилактики туляремии в России применяется вакцина туляремийная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения, изготавливаемая на основе эталонного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (далее вакцинный штамм). Для определения специфического иммунитета и диагностики туляремии используется Аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), представляющий собой убитую нагреванием взвесь вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Производство вакцины туляремийной живой на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (*F. tularensis* 15 восстановленный) было разрешено Приказом Министерства здравоохранения РСФСР от 25.05.1963 г.

Образцы эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Эффективность туляремийных иммунобиологических лекарственных препаратов обеспечивается иммуногенной активностью вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В условиях его сохранности и в процессе производства туляремийных иммунобиологических лекарственных препаратов фенотипические и генетические свойства вакцинного штамма могут изменяться. Для подтверждения стабильности вакцинного штамма проводится постоянное изучение его основных свойств в течение регламентируемого срока годности (10 лет). В случае выявления изменений нормы показателей, характеризующих штамм, как вакцинный, следует принимать своевременные меры для восстановления его типичных фенотипических и генетических свойств.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Порядок изучения, изготовления, хранения и поддержания вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

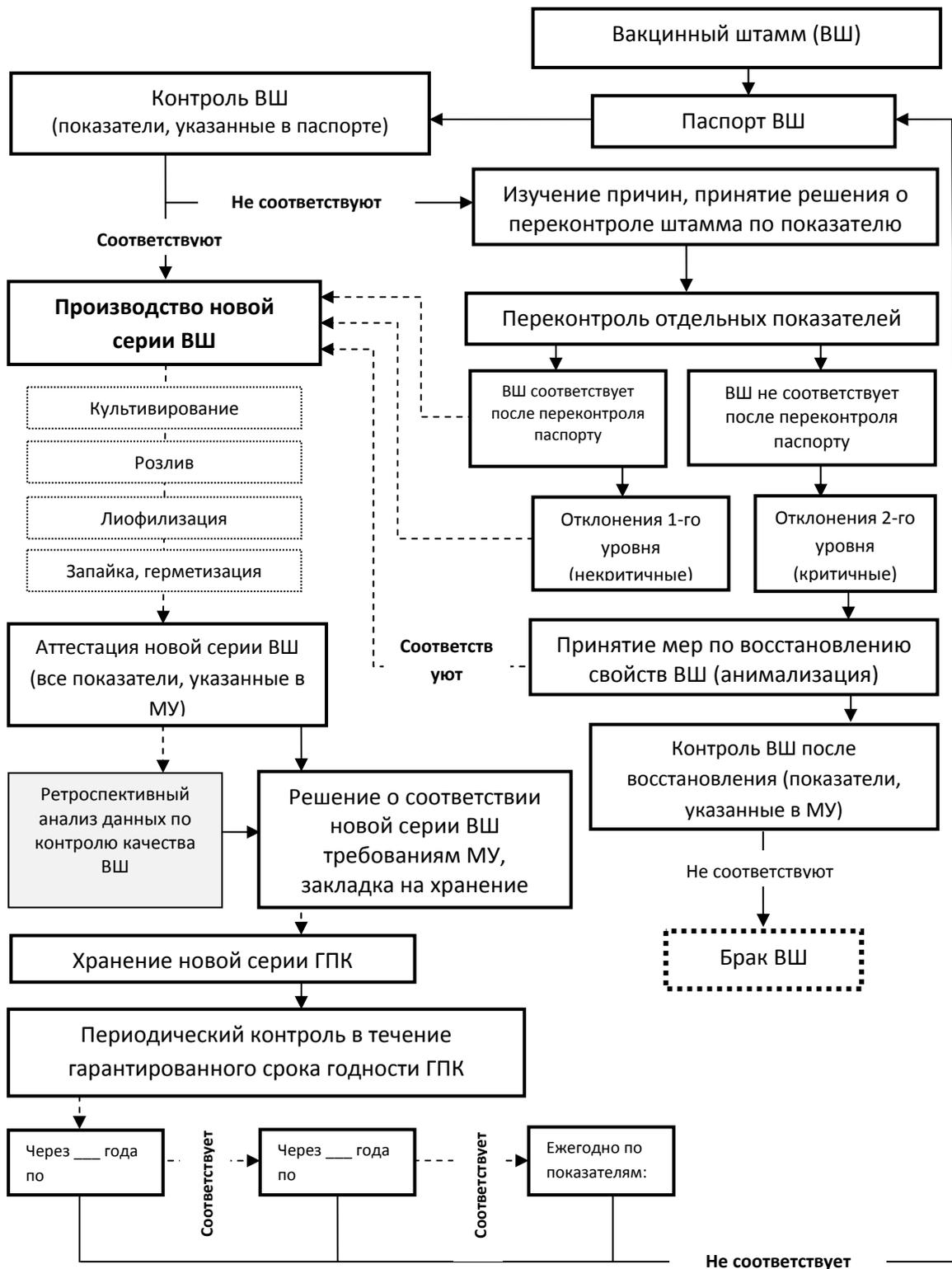


Рисунок Д.1 – Порядок изучения, изготовления, хранения и поддержания
вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

2 Требования к вакцинному штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Вакцинный штамм относится к голарктическому подвиду; не должен вызывать заболевание у людей и лабораторных животных; иметь остаточную вирулентность для белых мышей и морских свинок и способность приживаться и вызывать иммунологическую перестройку в привитом организме.

Содержание Паспорта вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Приложение 1).

Вакцинный штамм должен обладать типичными культурально-морфологическими, биохимическими (таблица Д.1), иммунобиологическими и генетическими свойствами для рода *Francisella*, вида *tularensis*, подвида *holarctica*.

Таблица Д.1 – Основные фенотипические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Свойства штамма	Показатели	Характеристика
Тинкториальные и морфологические	Окраска по Граму	Грамотрицательные палочковидные или коккоидные плеоморфные бактерии
	SR- тип колоний (белые)	Не менее 80 %
Биохимические	Глюкоза	+(кислота)
	Мальтоза	+(кислота)
	Левулеза	+(кислота)
	Манноза	+(кислота)
	Глицерин	-
	Цитруллин	-
	Сероводород	+
	Индол	-
Серологические	РА с сывороткой туляремийной	До титра сыворотки, крупнохлопчатый агглютинат

2.1 Морфология

Вакцинный штамм представляет собой чистую культуру туляремиального микроба - мелкие (0,2 - 0,7 мкм), короткие палочковидные или коккоидные плеоморфные бактерии, окруженные слабо выраженной капсулой, не имеет жгутиков, спор не образует.

2.2 Культурально-морфологические свойства

Вакцинный штамм растет слабо или не растет на питательных средах необогащенных кровью, ее фракциями или желтком куриных яиц. Является строгим аэробом, оптимальная температура для выращивания - 37 ± 1 °С.

На питательной среде Мак-Коя через 48-72 ч инкубирования при температуре 37 ± 1 °С должен расти в виде извилистого, слегка блестящего, почти бесцветного налета; на плотной агаровой рыбно-дрожжевой цистиновой среде должен образовывать в виде капелек колонии беловатого цвета, иногда с голубоватым отливом; на питательной среде FT-агар – серовато-белые, круглые с ровным краем, выпуклые, блестящие колонии диаметром не менее 1 мм. При высеве культуры методом штриховых посевов колонии могут достигать в диаметре 2 мм и более.

2.3 Биохимические свойства

Вакцинный штамм должен ферментировать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, маннозу и левулезу; не ферментировать глицерин; выделять сероводород; не образовывать индол.

2.4 Антигенные свойства

Туляремиальный микроб содержит соматический O- и оболочечный Vi (видоспецифический) антигенные комплексы. С Vi антигеном связаны вирулентность и иммуногенные свойства туляремиального микроба.

Наибольшую иммунологическую значимость имеет ЛПС, компонент внешней мембраны туляремиального микроба, нарушение синтеза которого обуславливает диссоциацию клеток *F. tularensis* из S- в R-форму, лишенную специфических боковых O-цепей. Авирулентные штаммы туляремиального

микроба, содержат только О-антиген. Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ содержит О-антиген и уменьшенное количество Vi -антигена.

Процесс диссоциации влияет на иммунологические свойства вакцинного штамма и может приводить к снижению или полной утрате его иммуногенности. Степень диссоциации вакцинного штамма оценивают по формированию не менее 80 % иммуногенных SR-тип колоний (белые) при культивировании на питательных средах (рыбно-дрожжевой цистиновый агар или FT-агар). Признаком диссоциации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ является изменение цвета колоний (серые).

Определение степени диссоциации вакцинного штамма является обязательным условием для подтверждения сохранности его иммуногенных свойств.

2.5 Серологические свойства

Двухсуточная культура вакцинного штамма должна агглютинироваться сывороткой диагностической туляреминой для РА до ее титра с образованием крупно-хлопчатого агглютината.

2.6 Отсутствие посторонних бактерий и грибов

Вакцинный штамм должен представлять чистую живую культуру туляреминого микроба и не должен содержать посторонних микроорганизмов и грибов.

2.7 Генетические свойства

Вакцинный штамм должен иметь в своем геноме генетические маркеры, характерные для вида *F. tularensis* (iglBC, ISFtu5, fopA), подвида *holarctica* (аллели генов Ft-M19, ISFtu2, специфичные для штаммов *F. tularensis* подвида *holarctica*) и RAPD профили.

2.8 Остаточная вирулентность

Остаточная вирулентность вакцинного штамма для белых мышей массой 19 ± 1 г должна быть в пределах LD_{50} от 100 до 5×10^3 м.к. при подкожном введении в объеме 0,5 мл двухсуточной культуры штамма в концентрациях 5, 50, 500, 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 м.к./мл.

2.9 Специфическая безопасность

Вакцинный штамм должен быть безвредным для морских свинок. Морская свинка массой не менее 450 ± 50 г должна выжить в течение 15 сут после подкожного введения объемом 1 мл двухсуточной культуры в концентрации 5×10^9 м.к./мл.

2.10 Специфическая активность

Концентрация микробных клеток вакцинного штамма в ампуле должна быть не менее $12,0 \times 10^{10}$ м.к./мл. Колебания результатов определений в отдельных ампулах с лиофилизированной культурой вакцинного штамма не должны превышать 5 % от средней арифметической величины.

В выросшей культуре при высеве 100 м.к. вакцинного штамма на чашки Петри рыбно-дрожжевого цистинового питательного агара или питательной среды FT-агар с добавлением 5 % крови кролика или барана должно содержаться не менее 80 % иммуногенных SR-типа колоний (белые) от общего количества выросших колоний.

ED_{50} вакцинного штамма должна составлять не более 1000 м.к. для иммунизированных вакцинным штаммом морских свинок (масса 300 ± 50 г) подкожно дозами 5, 50, 500, 5×10^3 , 5×10^4 м.к./мл с последующим инфицированием вирулентной культурой штамма *F. tularensis* 503/840 дозой 1000 Dcl (1 Dcl- 5 м.к.)

2.11 Прививаемость

При накожной иммунизации морских свинок массой 300 ± 50 г культурой вакцинного штамма в концентрации дозой 5×10^9 м.к./мл через

2 - 5 сут у всех животных вокруг насечек должна наблюдаться прививочная реакция в виде инфильтрата и гиперемии диаметром 5 - 15 мм.

3 Условия работы с вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Работы по изготовлению вакцинного штамма проводятся в производственных помещениях, соответствующих правилам надлежащей производственной практики (GMP).

Работы по контролю вакцинного штамма проводятся в специальном помещении, где не проводят работы и хранение с использованием иных биологических агентов, в том числе с ПБА I-IV групп патогенности.

4 Требования к персоналу

К работе с вакцинным штаммом допускается квалифицированный персонал, владеющий методами пассирования, изготовления и контроля вакцинного штамма. Персонал, непосредственно занятый в изготовлении вакцинного штамма, должен быть привит вакциной туляремийной живой и проходить периодические медицинские осмотры в сроки, утвержденные руководителем предприятия-изготовителя препарата.

Запрещается допускать к работе лиц, которые в тот же день работали с инфекционным материалом или с лабораторными животными в виварии. При возникновении внештатной ситуации в ходе проведения работ с вакцинным штаммом, персонал должен своевременно принять соответствующие меры для ее устранения.

5 Место хранения и передачи вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Ампулы с лиофилизированными эталонной и производственной культурами вакцинного штамма должны храниться в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в отдельно выделенном помещении,

где не хранятся другие культуры микроорганизмов и иммунобиологические препараты, в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °С. Не допускается хранение в одной морозильной камере вакцинных штаммов других видов микроорганизмов.

Металлические пеналы и морозильные камеры, в которых хранится эталонная линия вакцинного штамма, должны быть опечатаны печатями сотрудников, осуществляющих оценку качества туляремийной вакцины живой и в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности (ГКПМ), имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

В помещении должна иметься опись штаммов, находившихся на хранении в морозильной камере. Температура в морозильной камере должна ежедневно контролироваться назначенным сотрудником с занесением записи в журнал, оформленный в соответствии с установленными требованиями.

Ампулы с лиофилизированной производственной культурами вакцинного штамма на предприятии-изготовителе туляремийных иммунобиологических лекарственных препаратов должны храниться в отдельном выделенном помещении, где не хранятся другие культуры и иммунобиологические препараты, в металлических пеналах в условиях при температуре не выше минус 20 °С. Не допускается хранение в одной морозильной камере вакцинных штаммов других видов микроорганизмов.

При возникновении непредвиденных ситуаций (технические неполадки работы морозильной камеры и др.) должны быть в наличии резервные морозильные камеры.

Производство вакцины живой туляремийной должно осуществляться с использованием лиофилизированной культурой эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ или другого, признанного в установленном порядке вакцинным штаммом, хранящихся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности (ГКПМ).

Для изготовления очередной серии производственной линии вакцинного штамма должна использоваться эталонная линия вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, последней даты изготовления или одной из предыдущих серий, которые по фенотипическим и генетическим свойствам, соответствуют указанным свойствам при его происхождении. Образцы эталонной линии вакцинного штамма хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Перед началом производственного процесса изготовления вакцины туляремийной живой предприятие-изготовитель проводит испытание (контроль) производственной линии вакцинного штамма и передает протоколы испытаний в уполномоченное учреждение. При установлении несоответствия регламентируемых свойств производственной линии вакцинного штамма, предприятие-изготовитель в соответствии с официальной заявкой, оформленной в установленном порядке, получает эталонную линию вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

В течение срока годности лиофилизированной культуры производственной линии вакцинного штамма на предприятии-изготовителя вакцины туляремийной живой, а по истечении срока годности - на предприятии-изготовителя и в уполномоченном учреждении изучают его культурально-морфологические, биохимические, иммунобиологические, серологические и генетические свойства. Производственный вакцинный штамм считается выдержавшим испытание, если по фенотипическим и генетическим свойствам соответствует эталонному вакцинному штамму при его происхождении. При несоответствии вакцинного штамма по фенотипическим и генетическим свойствам, а также установленным требованиям спецификации, хотя бы по одному из показателей, проводится

повторный контроль вакцинного штамма по показателям, не выдержавшим испытания.

Если вакцинный штамм не прошел повторных испытаний, принимается решение о проведении комплекса мероприятий по восстановлению его утративших, как вакцинного штамма, свойств. При невозможности проведения вышеуказанных мероприятий принимается решение об использовании другой серии эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранящейся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III-IV патогенности.

6 Изготовление эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Перед воспроизведением культуры вакцинного штамма на базе предприятия-изготовителя вакцины туляремийной проводят его анимализацию путем пассажа через организм морской свинки массой 290 ± 10 г.

6.1 Подготовка вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для анимализации

Для изготовления очередной серии эталонной линии вакцинного штамма используют лиофилизированную культуру вакцинного штамма последней даты изготовления или одной из предыдущих серий, которые по фенотипическим и генетическим свойствам, соответствуют вакцинному штамму при его происхождении. Ампулу с лиофилизированной культурой эталонной линии вакцинного штамма вскрывают с соблюдением правил асептики, восстанавливают содержимое 0,9 % раствором натрия хлорида и высевают в 7 пробирок со скошенной питательной средой Мак-Коя* (I пассаж).

Посевы с культурой вакцинного штамма инкубируют в течение 48 ± 1 ч при температуре 37 ± 1 °С. Затем выросшую культуру высевают в

пробирки с указанной выше питательной средой (II пассаж) и инкубируют в тех же условиях. Культуру II пассажа вакцинного штамма изучают по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам, степени диссоциации и на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов.

Посевы с культурой II пассажа вакцинного штамма просматривают на характер роста и отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, готовят мазки по Граму. В пробирках с посевами должен наблюдаться рост туляремийного микроба в виде извилистого, слегка блестящего, почти бесцветного налета; не должен наблюдаться рост посторонних микроорганизмов и грибов; в окрашенных мазках должны наблюдаться только грамтрицательные палочковидные или коккоидные плеоморфные бактерии. Культура вакцинного штамма должна ферментировать с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу и мальтозу, не ферментировать глицерин; выделять сероводород; не образовывать индол; агглютинироваться СО сыворотки диагностической туляремийной для РА, до ее титра с образованием крупно-хлопчатого агглютината; содержать не менее 80 % иммуногенных SR-типа колоний (белые), выросших от общего количества.

Культуру II пассажа вакцинного штамма хранят при температуре $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, где не хранятся вакцинные штаммы других микроорганизмов и иммунобиологические лекарственные препараты, до окончания изготовления вакцинного штамма и его изучения.

6.2 Пассирование вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ через организм морских свинок

Культуру II пассажа вакцинного штамма смывают 0,9 % раствором натрия хлорида, разводят по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 ЕД, до концентраций 5×10^9 и 1×10^9 м.к./мл и каждую дозу вводят в

объеме 1 мл подкожно в паховую область 6 морским свинкам. Животных умерщвляют на 4-е сутки после введения культуры.

Животных вскрывают; стерильными инструментами, соблюдая правила асептики, берут ткань из места введения, регионарные лимфатические узлы (паховый, подвздошный), селезенку и помещают в стерильные чашки Петри. Селезенку и регионарный лимфатический узел (на стороне места введения) надрезают и методом отпечатков высевают каждый на отдельную агаровую пластинку в чашки Петри с рыбно-дрожжевым цистиновым агаром pH $7,1 \pm 0,1$.

Посевы инкубируют в течение 48 ± 2 ч при температуре 37 ± 1 °С. Чашки Петри с посевами просматривают, отбирают типичные колонии (в виде капелек беловатого цвета или с голубоватым отливом, размером не менее 1 мм и используют для изготовления эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Если в посевах селезенки выросли единичные колонии, следует использовать для высева максимальное количество типичных колоний, выросших в посевах подвздошного и регионарного лимфатических узлов.

6.3 Изготовление и лиофилизация вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Изготовление и лиофилизация культуры эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводится на базе предприятия-изготовителя вакцины туляремийной живой в соответствии с действующим Промышленным регламентом на «Вакцину туляремийную живую», лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения.

7 Изучение вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после лиофилизации

Испытание эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на соответствие установленным нормативным требованиям проводят на предприятии-изготовителе и уполномоченном учреждении по показателям: описание, определение наличия вакуума, время восстановления лиофилизата, подлинность; культурально-морфологические, биохимические, серологические и генетические свойства; отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов; специфическая безопасность; остаточная вирулентность; специфическая активность (концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации, иммуногенность); прививаемость.

7.1 Описание

Пористая масса белого с желтоватым оттенком цвета. Определение проводят визуально.

7.2 Определение наличия вакуума

Наличие вакуума в ампулах с вакцинным штаммом определяют с помощью аппарата д`Арсонваль/Тесла (ГФ, XIII, ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические лекарственные препараты»). Внутри ампулы должно наблюдаться бледно-голубое свечение газовой среды.

7.3 Время восстановления

Ллиофилизат вакцинного штамма должен полностью растворяться в течение 3 мин при добавлении в ампулу 1 мл воды для инъекций и при встряхивании образовывать гомогенную мутную суспензию белого с желтоватым оттенком цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев.

7.4 Подлинность

Вакцинный штамм в ампуле должен представлять чистую культуру туляремийного микроба. Определение проводят иммунофлуоресцентным

методом в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные. В мазках из микробной взвеси вакцинного штамма, окрашенной Иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремийными, должно наблюдаться специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

Допускается подтверждение подлинности вакцинного штамма с одним из зарегистрированных диагностических препаратов для идентификации туляремийного микроба.

7.5 Приготовление вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Исследуемую культуру вакцинного штамма высевают в пробирки со скошенной питательной средой Мак-Коя или FT – агаром и инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ± 1 ч (I пассаж). Выросшую культуру I пассажа высевают в пробирки с указанными выше питательными средами и инкубируют при тех же условиях (II пассаж). Все дальнейшие работы по изучению вакцинного штамма проводят с культурой II пассажа.

Культуру II пассажа вакцинного штамма хранят при температуре 4 ± 2 °С, где не хранятся вакцинные штаммы других микроорганизмов и иммунобиологические лекарственные препараты, до окончания эксперимента.

7.6 Культурально-морфологические свойства

Вакцинный штамм должен обладать культурально-морфологическими свойствами, характерными для рода *Francisella*, вида *tularensis*, подвида *holarctica*; должен расти на питательных средах, обогащенных кровью, ее фракциями или желтком куриных яиц. Температурный оптимум для развития характерных S- или SR – типа колоний составляет 37 ± 1 °С.

На скошенной питательной среде Мак-Коя через 48-72 ч инкубирования при температуре 37 ± 1 °С вакцинный штамм должен расти в виде

извилистого, слегка блестящего, почти бесцветного налета; на плотной агаровой рыбно-дрожжевой цистиновой среде с добавлением 5 % крови кролика или барана должен образовывать в виде капелек колонии беловатого цвета, иногда с голубоватым отливом; на питательной среде FT-агар образовывать серовато-белого цвета круглые, с ровным краем, выпуклые, блестящие колонии диаметром от 1 до 2,5 мм. В мазках, окрашенных по Граму, должен представлять грамотрицательные полиморфные (от кокковидных до палочковидных форм) палочки размером 0,2-0,7 мкм.

7.7 Биохимические свойства

Вакцинный штамм должен обладать типичными биохимическими свойствами, характерными для рода *Francisella*, вида *tularensis*, подвида *holarctica*.

Для определения биохимической активности вакцинного штамма используют системы индикаторные бумажные СИБ в соответствии с инструкцией по применению и питательную среду Dawns (Приложение 2).

Вакцинный штамм должен ферментировать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, маннозу и левулезу; не ферментировать глицерин; выделять сероводород; не образовывать индол.

Высевают агаровую культуру II пассажа в пробирки со скошенной питательной средой Dawns, содержащую указанные выше углеводы. Посевы с культурой и контрольные пробирки (без посева культуры) инкубируют при температуре 37 ± 1 °C в течение 5 сут. При ферментации вакцинным штаммом углеводов цвет питательной среды с зеленого изменяется на лимонный, при отрицательной реакции цвет среды остается без изменений.

Дополнительно ставят пробы на образование сероводорода и отсутствие выделения индола с применением СИБ.

7.8 Серологические свойства

Двухсуточная культура вакцинного штамма II пассажа должна агглютинироваться сывороткой диагностической туляремийной для РА до его титра с образованием крупнохлопчатого агглютината.

7.9 Генетические свойства

При исследовании ДНК вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ должны выявляться видоспецифические локусы: *iglBC*, *ISFtu5*. Для проведения исследования используют зарегистрированные препараты для генной диагностики туляремии («Ген *Francisella tularensis*- РФФ», «Ген *Francisella tularensis*- РЭФ», «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ»). Работу выполняют в соответствии с инструкциями по их применению.

При исследовании ДНК вакцинного штамма должны выявляться генетические маркеры, характерные для подвида *holarctica* туляремийного микроба: аллели генов *Ft-M19*, *ISFtu2*, специфичных для штаммов *F. tularensis* подвида *holarctica*. Для проведения исследования используют праймеры, рекомендованные ВОЗ, для определения подвидовой принадлежности туляремийного микроба: FT-M19f-FT-M19r (локус *Ft-M19*), Tuf1705-TuBR431 (локус *ISFtu2*) (Приложение 3).

Работу выполняют в соответствии с Практическим руководством «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» М., 2013. При проведении ПЦР с указанными праймерами с ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ должны амплифицироваться фрагмент гена *Ft-M19* размером 220 п.н. и гена *ISFtu2* размером 1248 п.н.

Вакцинный штамм должен иметь стабильные, характерные для данной культуры RAPD-профили. Для проведения исследования используют праймеры, предложенные V.A. de la Puente-Redondo *et al.*: Universal M13, T3, T7. Амплификацию осуществляют либо с одним праймером Universal M13, либо с двумя праймерами T3 и T7. Концентрация праймеров в реакционной смеси должна быть не менее 15 пМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, ионов Mg^{2+} - 2,5 мМоль, фермента Dream Taq-полимеразы – 4 ед. Амплификацию

осуществляют по следующей программе: 94 °С – 5 мин; 2 цикла 94 °С – 5 мин, 40 °С – 5 мин, 72 °С – 5 мин; 35 циклов 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин, 72 °С – 5 мин. Учет результатов проводят в 2 % агарозном геле в 1 × ТАЕ буфере при градиенте напряжения 5 В/с в течение 1,5-2 ч в соответствии с рекомендациями производителя к камере для электрофореза и источнику тока. Длина геля должна быть не менее 10 см. Для определения размера полученных аппликонов используют маркер молекулярных масс, включающий фрагменты размером 100, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000 п.н.

При RAPD типировании с праймерами T3-T7 должны определяться фрагменты размером ~ 1000, 1400, 1900, 2200, 4000 п.н. (рисунок Д. 2, А), с праймером Universal M13 ~ 750, 900, 1300, 1600, 3000 п.н. (рисунок Д.2, Б).

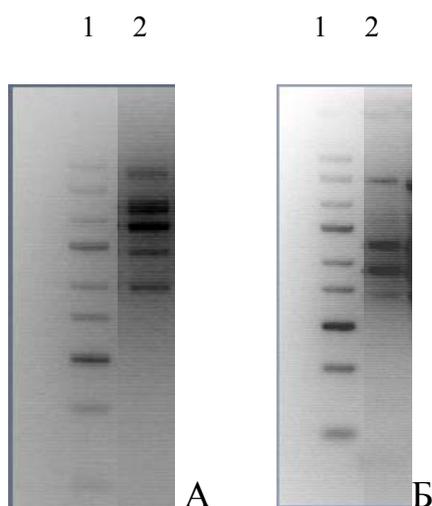


Рисунок Д.2 – Результаты RAPD с праймерами T3-T7 (А) и M-13 (Б) типирования культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ: 1 - маркер молекулярных масс (100, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000); 2 - *F. tularensis* 15 НИИЭГ

7.10 Отсутствие посторонних бактерий и грибов

Вакцинный штамм должен представлять чистую живую культуру туляремийного микроба и не должен содержать посторонних микроорганизмов и грибов.

Тиогликолевая среда, используемая для контроля чистоты вакцинного штамма, должна быть прозрачной. Перед проведением испытания не менее, чем из 3-х образцов тиогликолевой среды, делают мазки, окрашивают по Граму и просматривают под микроскопом не менее 30 полей зрения в каждом для исключения отсутствия мешающих факторов.

За один образец принимают содержимое двух ампул. В ампулы с лиофилизированной культурой вакцинного штамма пипеткой вносят по 1 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида, затем объединяют в одну ампулу и по 1 мл из каждого образца высевают в две пробирки (d – 2 см, h – 20 см), содержащие по 20 мл тиогликолевой среды.

Одну из двух пробирок из каждого образца инкубируют при температуре от 30 до 35 С для выявления аэробных и анаэробных бактерий, другую - при температуре от 20 до 25 С для выявления грибов. Через 5-7 сут из каждой пробирки, хранившихся при температурах от 30 до 35 °С и от 20 до 25 °С, проводят высев по 0,5 мл в 2 пробирки, содержащие по 10 мл тиогликолевой среды. Пробирки выдерживают при соответствующих температурах до 14 сут со дня первичного посева. Через 14 сут выращивания из пробирок с посевами и пересевами готовят мазки, окрашивают по Граму и просматривают под микроскопом.

В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек - этот образец считают загрязненным посторонней микрофлорой. При выявлении в образце вакцинного штамма грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от туляремийного микроба, из этого образца готовят 3 мазка, которые окрашивают набором реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные» и просматривают под фазово- контрастным и люминесцентным микроскопом не менее 30 полей зрения в каждом.

Если не все микробные клетки, обнаруживаемые под фазовым контрастом, окрашиваются специфически (ярко-зеленое свечение по

периферии клеток) набором реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные», данный образец вакцинного штамма считают загрязненным посторонней микрофлорой. В этом случае контроль повторяют на удвоенном количестве образцов. В случае наличия роста посторонней микрофлоры при повторном высеве, хотя бы в одной пробирке, изготовленную серию вакцинного штамма считают контаминированной и бракуют.

7.11 Остаточная вирулентность

Культура вакцинного штамма должна обладать остаточной вирулентностью для белых мышей, выраженной в LD₅₀ в пределах от 100 до 5×10^3 м.к. Двухсуточную культуру вакцинного штамма II пассажа со скошенной питательной среды Мак-Коя или FT-агара суспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 ЕД. Далее микробную взвесь разводят десятикратно 0,9 % раствором натрия хлорида от 10^{-1} до 10^{-9} и из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} (концентрации 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 и 5 м.к./мл) вводят в объеме 0,5 мл подкожно в заднюю правую лапку белым мышам массой $19 \pm 1,0$ г. На каждое разведение используют по 10 белых мышей. Всего в испытании используют 70 животных. Культуру вакцинного штамма вводят животным одним шприцем, начиная с наименьшей дозы.

Гибель белых мышей учитывают в сроки от 3 до 21 сут после введения вакцинного штамма. Животных, павших на 5-10 сут, вскрывают по общепринятой методике, отмечают патологоанатомические изменения, характерные для туляремии (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Соблюдая правило асептики, делают продольный срез селезенки и методом отпечатков высевают на

питательную среду Мак-Коя или FT-агар. Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °C в течение 10 сут и ежедневно просматривают.

При обнаружении в посевах роста культуры, проводят идентификацию с помощью набора реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные». В мазках из всех органов павших животных, в том числе из селезенки, должны быть выделены микробные клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Положительные данные при бактериоскопии мазков-отпечатков из органов учитывают у животных, павших до 10 сут после введения вакцинного штамма. Далее проводят учет только павших белых мышей.

Гибель мышей от вакцинного штамма устанавливают на основании патологоанатомических данных вскрытия (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки) и выделения из посевов туляремийного микроба.

Величину LD₅₀ определяют по формуле (1):

$$\lg LD_{50} = \lg D - 1 (\sum L_i - 0,5), \quad (1)$$

где D - максимальная из испытываемых доз,

L_i- отношение числа животных, павших при введении данной дозы к общему числу животных, которым эта доза была введена,

$\sum L_i$ - сумма значений L_i, найденных для всех испытываемых доз.

Если величина LD₅₀ окажется выше или ниже установленной нормы опыт повторяют. Если в повторном опыте величина LD₅₀ будет также не соответствовать норме, вопрос о применении штамма в производстве вакцины туляремийной живой должен решаться с участием специалистов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России/уполномоченного учреждения, определенного в установленном порядке.

7.12 Специфическая безопасность

Вакцинный штамм должен быть безвредным.

Двухсуточную культуру штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ II пассажа с питательных сред Мак-Коя или FT-агара суспендируют 0,9 % раствором натрия хлорида, разводят до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. В объеме 1 мл культуру вводят подкожно в область бедра одной морской свинке массой 450 ± 25 г. Вакцинный штамм не должен вызывать гибели животного в течение 15 сут наблюдения. В месте введения допускается некроз тканей кожи и подкожной клетчатки.

В случае гибели морской свинки контроль повторяют на удвоенном количестве животных.

7.13 Специфическая активность

7.13.1 Концентрация микробных клеток в ампуле

В вакцинном штамме должно содержаться не менее $12,0 \times 10^{10}$ м.к./мл. Колебания результатов определений в отдельных ампулах со штаммом не должны превышать 5 % от средней арифметической величины. Испытания проводят в соответствии с ОФС 1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток».

Определение проводят в трех образцах (один образец – содержимое двух ампул). В две ампулы с вакцинным штаммом вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида рН $7,1 \pm 0,1$ и после получения гомогенной суспензии объединяют содержимое ампул. Из каждого образца 0,5 мл суспензии используют для определения концентрации микробных клеток в 1 мл. Для этого по 0,5 мл каждого образца вносят в отдельные стандартные пробирки и вносят 0,9 % раствор натрия хлорида до концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей, равной 10 МЕ.

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяют по формуле (2):

$$OK = \frac{(0,5+V) \cdot 5 \cdot 10^9}{0,5}, \quad (2)$$

где V – объём 0,9 % раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл,

0,5 – объём испытуемого образца, мл,

5×10^9 м.к./мл – эквивалент туляремийного микроба, соответствующий ФСО мутности бактериальных взвесей, равной 10 МЕ.

7.13.2 Количества живых микробных клеток

Вакцинный штамм должен содержать не менее 40 % жизнеспособных клеток туляремийного микроба от общего количества микробных клеток. Колебания результатов определений в образцах не должны превышать 20 % от средней арифметической величины.

При определении количества живых микробных клеток используют концевые химически чистые пипетки и пробирки с 0,9 % раствором натрия хлорида, охлажденные до температуры от 2 до 8 °С.

Предварительно проверяют качество рыбно-дрожжевого цистинового питательного агара или питательной среды FT-агар, использующихся для определения количества живых микробных клеток.

Для этого двухсуточную культуру действующего вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. Затем в 0,9 % растворе натрия хлорида делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-7} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл и из разведения 10^{-7} (100 м.к.) по 0,1 мл микробной взвеси высевают на 3 чашки Петри используемой питательной среды. Питательная среда должна обеспечивать рост туляремийного микроба при высевае 10 м.к. через 72 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С.

Для определения количества живых микробных клеток из приготовленных ранее образцов (см. подраздел 7.13.1) делают в 0,9 % растворе натрия хлорида последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-7} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Отдельно для каждого образца из разведения 10^{-7} (100 м.к.) по 0,1 мл микробной взвеси высевают на 3 чашки Петри рыбно-дрожжевого цистинового питательного агара или питательной среды FT-агар.

Учет результатов определения количества живых микробных клеток проводят через 5 сут инкубирования посевов при температуре 37 ± 1 °С.

За количество живых микробных клеток принимают среднюю арифметическую определений количества выросших колоний в 3 образцах. Полученную величину умножают на степень разведения культуры (10^{-7}) и увеличивают в 10 раз (для контроля используют 0,1 мл суспензии), получая количество живых клеток туляремийного микроба, содержащихся в 1 мл вакцинного штамма.

Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывают по формуле (3):

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где БК – количество живых м.к. в 1 мл,

ОК – общая концентрация м.к. в 1 мл.

7.13.3 Диссоциация

Вакцинный штамм должен содержать не менее 80 % иммуногенных колоний SR-типа белого цвета.

Для определения степени диссоциации двухсуточную культуру вакцинного штамма II пассажа с рыбно-дрожжевого цистинового агара или FT-агара суспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации по

ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ, разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 5 раз и делают последовательные десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-7} . Из разведения 10^{-7} (100 м.к.) высевают по 0,1 мл на 3 чашки Петри рыбно-дрожжевого цистинового агара или FT-агара с добавлением 5 % крови кролика или барана.

Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 5 сут, затем дополнительно выдерживают в холодильнике при температуре 4 ± 2 °С в течение 24 ч. Далее подсчитывают число иммуногенных SR-тип колоний (белые) и неиммуногенных колоний (серые), затем высчитывают их процентное соотношение.

7.13.4 Иммуногенность вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

ED₅₀ вакцинного штамма, способной защитить морских свинок от туляремийной инфекции, должна составлять не более 1000 микробных клеток.

После инкубации в течение 48 ± 1 ч двухсуточную культуру вакцинного штамма II пассажа с питательной среды Мак-Коя или FT-агара суспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. Затем делают десятикратные разведения микробной взвеси от 10^{-1} до 10^{-9} и из разведений 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} (концентрации 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 и 5 м.к./мл) иммунизируют в объеме 1 мл подкожно в область бедра морских свинок массой 300 ± 50 г. На каждую дозу используют по 4 морские свинки. Всего в опыте используют 20 животных.

Культуру вакцинного штамма вводят животным одним шприцем, начиная с наименьшей дозы. Для определения ED₅₀ при подсчете количества фактически введенных микробных клеток вакцинного штамма проводят высев из разведения 10^{-7} (100 м.к.) по 0,1 мл на 5 чашек Петри с FT-агаром. Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 5 сут.

Подсчитывают количество выросших колоний и определяют фактическую дозу вакцинного штамма, введенную морским свинкам.

Через 28 ± 2 сут после иммунизации вакцинным штаммом животных инфицируют подкожно в объеме 1 мл культурой вирулентного штамма *F. tularensis* 503/840 дозой равной 1000 Dcl (Приложение 4).

Одновременно инфицируют вирулентной культурой 3-х неиммунизированных морских свинок дозой 1000 Dcl и 3-х неиммунизированных морских свинок дозой 1 Dcl (контроль). За инфицированными иммунизированными и неиммунизированными животными наблюдают в течение 30 сут. Все неиммунизированные морские свинки должны погибнуть от туляремийной инфекции в течение 16 сут. В случае выживания контрольных животных опыт следует повторить, используя другой, более вирулентный штамм *F. tularensis*.

ED₅₀ вычисляют по формуле (4):

$$\lg ED = \lg - l(\sum Li - 0,5) \quad (4)$$

где D – максимальная, из испытанных доз,

Li - отношение числа животных, иммунизированных данной дозой и выживших после заражения, к общему числу животных, взятых в опыт,

$\sum Li$ - сумма значений Li, найденных для всех испытанных доз.

7.14 Прививаемость

При накожной иммунизации морских свинок вакцинным штаммом через 2 - 5 сут у животных вокруг насечек должны образоваться инфильтрат и гиперемия диаметром 5 - 15 мм.

Двухсуточную культуру штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ II-го пассажа с питательной среды Мак-Коя или FT-агара суспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. Полученную микробную взвесь

десятикратно разводят до концентраций 5×10^7 и 5×10^6 м.к./мл и прививают по 2 морские свинки массой 300 ± 50 г накожно методом скарификации в объеме 0,1 мл.

Для этого боковую поверхность животного обрабатывают депиллятором. Участок депилированной кожи, предварительно обрабатывают спиртом и эфиром (1:1), затем после испарения эфира наносят пипеткой 2 капли микробной взвеси одной из концентрации на расстоянии 20 - 30 мм одна от другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по две параллельные насечки длиной 8 - 12 мм. Нанесенную на кожу микробную взвесь тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной оспопрививательного пера. Насечки делают таким образом, чтобы кровь выступала мелкими росинками, но не кровоточили. У всех привитых животных на 2-5 сут должна появиться кожная реакция в виде инфильтрата и гиперемии вокруг насечек размером 5 - 15 мм.

Если прививаемость вакцинного штамма не удовлетворяет установленным требованиям, контроль повторяют по той же методике. Если при повторном определении прививаемость не соответствует установленной норме, вакцинный штамм считают не выдержавшим испытание.

8 Поддержание вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в течение срока годности, хранение и транспортирование

8.1 Движение вакцинного штамма после получения

После изучения вакцинного штамма на предприятии-изготовителе в соответствии с установленными требованиями оформляют Сертификат анализа/паспорт, в который вносят полученные результаты испытаний, и Сводный протокол, включающий этапы его изготовления. Вакцинный штамм с сопроводительными документами высылают на изучение по всем показателям в уполномоченное учреждение, и на поддержание и хранение в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов III-IV групп патогенности.

Перед каждым производственным циклом изготовления вакцины туляремийной живой проводят изучение производственной линии вакцинного штамма на остаточную вирулентность, специфическую безопасность, прививаемость и иммуногенность. Все сведения о результатах изучения производственной линии вакцинного штамма фиксируют в протоколах. Протоколы ежегодного изучения вакцинного штамма перед началом производственного процесса вакцины живой туляремийной на предприятии-изготовителе направляют в уполномоченное учреждение.

8.2 Срок годности

Срок годности - 10 лет.

8.3 Хранение и транспортирование

Хранят при температуре не выше минус 20 °С.

Транспортирование при температуре от 2 до 8 °С.

9 Требования безопасности

Работа проводят в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методические рекомендации устанавливают требования к порядку изготовления, изучения, хранения и поддержания эталонной линии вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, используемого для производства вакцины туляремийной живой, аллергена туляремийного жидкого (Тулярин) и контроля диагностических туляремийных препаратов.

Методические рекомендации предназначены для предприятий и организаций Российской Федерации, осуществляющих хранение вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и производство туляремийных иммунобиологических лекарственных препаратов, независимо от ведомственной принадлежности; для учреждений осуществляющих свою деятельность в целях обеспечения государственного санитарно-эпидемиологического надзора; других органов и организаций, осуществляющих контроль за качеством и безопасностью препаратов для профилактики и диагностики туляремии.

Для проведения испытаний по восстановлению свойств вакцинного штамма приказом Министерства здравоохранения России утверждается комиссия в составе специалистов производителя-изготовителя туляремийной вакцины, учреждения, уполномоченного для поддержания и хранения вакцинного штамма, и референс-центра по туляремии, назначенных в установленном порядке.

Приложение 1

Паспорт вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

1. Наименование штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ
2. Назначение
3. Источник получения
4. Дата получения
5. Способ и условия культивирования:
 - питательная среда
 - температура культивирования
 - продолжительность культивирования
6. Условия и дата лиофилизации
7. Подлинность культуры
8. Концентрация в м.к.
9. Культурально-морфологические и тинкториальные свойства
10. Морфология клеток, окрашенных по Граму
11. Количество иммуногенных SR колоний
12. Биохимические свойства
13. Серологические свойства
14. Генетические свойства
15. Остаточная вирулентность
16. Безвредность
17. Прививаемость
18. Иммуногенность
19. Условия хранения
20. Срок годности

Приложение 2

Питательные среды, используемые при контроле вакцинного штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ

Приготовление рыбно-дрожжевой питательной среды с цистином и глюкозой:

рыбный гидролизат (свежие окунь, щука, карась) - 0,2-0,3 л,

желатиновый гидролизат - 0,11 л;

дрожжевой аутолизат (дрожжи пекарские, ГОСТ 171-81) - 0,01-0,034 л;

натрия хлорид х.ч., ГОСТ 4233-77- 4 г;

глюкоза ГОСТ 975-88- 11 г;

L-цистин х.ч., ТУ 6-09-3252-80- 1 г;

Желатин, ГОСТ 11293-89 – 15 г;

агар пищевой по ГОСТ 16280-2002 – 30 г;

вода для инъекций – до 1 л;

величина рН $7,6 \pm 0,1$.

Стерилизовать при температуре (120 ± 2) °С.

Срок хранения питательной среды не более 14 сут при температуре (6 ± 2) °С.

Приготовление питательной среды Мак-Коя:

Свежие куриные яйца (10 штук) моют щеткой и мылом под проточной водопроводной водой температуры 37 ± 1 °С, помещают на 20 мин в 5 % раствор натрия двууглекислого (ГОСТ 2156-76), промывают водой температурой 37 ± 1 °С и помещают на 2 ч в емкость с 70 % спиртом этиловым. После этого стерильно, тщательно отделяя от белка, извлекают желток, вносят в стерильную градуированную емкость и добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида рН $7,0 \pm 0,2$ (пропорция 60:40).

Приготовленную желточную среду разливают по 10 мл в стерильные пробирки и помещают в аппарат для свертывания и инактивации сыворотки

при температуре 80 ± 1 °С в течение 1 ч. Затем выдерживают в термостате при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 ч.

Среда должна быть желтого цвета, эластичной, без конденсата и трещин.

Срок хранения питательной среды Мак-Коя не более 14 сут при температуре 4 ± 2 °С.

Приготовление мясо-пептонного агара:

Мясо-пептонный агар с 0,5% глюкозы

Вода мясная (1:2) – 1000 мл

Пептон ферментативный сухой – 10 г

Натрия хлорид – 5 г

Глюкоза – 5 г

рН среды – $7,2 \pm 0,2$.

Стерилизация при температуре 120 ± 1 °С в течение 30 мин.

Срок хранения питательной среды не более 14 сут при температуре 4 ± 2 °С.

Приготовление питательной среды Dawns:

мясопептонный агар – 100 мл;

цистеин – 0,05 г;

индикатор бромтимоловый синий – 0,4 мл спиртового раствора;

глицерин - 1 мл или по 1 г углеводов (глюкоза (ГОСТ 995-88), мальтоза (ГОСТ 6038), манноза (ГОСТ 6038), левулеза (ГОСТ 6038)).

Приготовленную среду стерилизуют при температуре 114 ± 2 °С в течение 20 мин, затем охлаждают до температуры 45 ± 5 °С и добавляют 5 % (от общего объема) нормальной лошадиной сыворотки; устанавливают величину рН $7,0 \pm 0,1$ (подкисляют соляной кислотой в разведении 1:1 или подщелачивают 20 % раствором натрия гидроксида).

Цвет готовой среды должен быть зеленым.

Срок хранения питательной среды не более 14 сут при температуре 4 ± 2 °С.

Приготовление питательной среды FT-агар:

Питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT- агар) выпускается в ФБУН ГНЦПМБ (Оболенск) в виде комплекта, состоящего из основы и глюкозо-витаминовой добавки (ГВД). Состав, способ приготовления и условия хранения питательной среды описаны в инструкции по применению FT- агара, прилагаемой к комплекту.

Приложение 3

Оборудование, реактивы и материалы

1. Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08923).
2. Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба, сухая (FT-агар)», Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00899.
3. СО – стандартный образец сыворотки диагностической туляремийной для РА.
4. ФСО – отраслевой стандартный образец мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ (международные единицы), соответствующий 5×10^9 м.к./мл туляремийного микроба.
5. СИБ (Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04148)
6. Пипетки - ГОСТ 29229-95.
7. Пробирки (d - 2 см, h - 20 см) – ГОСТ 25336-82У.
8. Термоциклер для ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, термоциклер для ПЦР с электрофоретической детекцией.
9. Бокс биологической безопасности 2А класса.
10. ПЦР-бокс.
11. Электрофорезная камера.
12. Источник тока Эльф-4.
13. Твердотельный термостат для микропробирок объемом 1,5 мл.
14. Гель-документирующая система с трансиллюминатором
15. Микроцентрифуга-вортекс.
16. Центрифуга настольная для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 мл, скорость вращения до 13500 об/мин.
17. Морозильник, обеспечивающий температуру до минус 18 ± 1 °С.

18. Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру 4 ± 1 °С.
19. Набор автоматических дозаторов переменного объема на 0,5-10; 5-40; 40-200; 200-1000 мкл .
20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, 200 мкл и 1000 мкл.
21. Микроцентрифужные пробирки с плоской крышкой вместимостью 0,2 мл.
22. Микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл.
23. Микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,6 мл.
24. Штатив «рабочее место» для пробирок вместимостью 1,5, 0,6 или 0,2 мл.
25. Dream Taq-полимера в комплекте с буфером (Fermentas, США).
26. раствор маркеров размера ДНК.
27. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
28. Вода свободная от нуклеаз (путем фильтрации).
29. Магний хлористый ($MgCl_2$), 25 мМ раствор.
30. Смесь дНТФ, 25 мМоль раствор.
31. Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300-87.
32. 50 × ТАЕ (Amresco, США)
33. Агароза с высокой разрешающей способностью NuSieve 3:1 (Amresco, США).
34. Праймеры:
 - Ft-M19f 5' – AGGCGGAGATCTAGGAACCTTT – 3',
 - Ft-M19r 5' – AGCCCAAGCTGACTAAAATCTTT – 3',
 - Tuf1705 5' – GATAGATACACGCCTTGCTCAA – 3',
 - TuBR431 5' – ACCCAGCCAATGCCTAAATA – 3'.
 - Universal M13 -5' – TTATGTAAAACGACGGCCAGT– 3'
 - T3 5' – GCAATTAACCCTCACTAAAG – 3'
 - T7 5' – GTAATACGACGCACTATAG -3'

35. Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РЭФ). Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12108.

36. Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Francisella tularensis* – РГФ). Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12107.

37. Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя туляремии методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Туляремия-РВ). Рег. уд. № РЗН 2015/2866.

Приложение 4

Требования и изготовление тест-штамма *F. tularensis* 503/840, используемого для контроля иммуногенности вакцины туляремийной живой и вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Иммуногенность вакцины туляремийной живой и вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ определяют с использованием вирулентного тест-штамма *F. tularensis* 503/840 (II группа патогенности), который получают из Государственной коллекции патогенных бактерий I-II групп патогенности ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ).

Вирулентная культура тест-штамма должна обладать типичными для туляремийного микроба голарктического подвида культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами; при подкожном введении 5 м.к. *F. tularensis* 503/840 по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ, должен вызывать гибель взятых в опыт трех белых мышей и трех морских свинок; при подкожном введении 6 белым крысам в дозах 5×10^9 и 5×10^6 м.к./мл должен вызывать их гибель в течение от 2-х до 7 сут с характерными для туляремийной инфекции патолого-анатомическими изменениями (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени) и выделением культуры от всех животных от дозы 5×10^9 м.к./мл и гибель всех или части белых крыс от дозы 5×10^6 м.к./мл.

1. Изготовление культуры тест-штамма *F. tularensis* 503/840

1.1. Пассирование культуры тест-штамма *F. tularensis* 503/840 через организм морских свинок.

Культуру тест-штамма *F. tularensis* 503/840 выращивают в течение 48 ± 1 ч при температуре 37 ± 1 °С в пробирках со скошенной питательной средой Мак-Коя или FT-агара (I пассаж), затем пересевают в пробирки с указанными выше питательными средами и инкубируют в тех же условиях (II пассаж).

Культуру тест-штамма II пассажа вводят 3 морским свинкам в дозе 100 м.к./мл по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ, в объеме 1 мл подкожно в область бедра (I пассаж). Выборку павших животных осуществляют не менее одного раза в сутки. Погибших в течение 3-5 сут животных вскрывают по общепринятой методике, отмечают патологоанатомические изменения, характерные для туляремии (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени).

Селезенку, соблюдая правила асептики, отделяют от связок; извлекают из брюшной полости, не повреждая кишечник; помещают в стерильную ступку; добавляют небольшое количество стерильного песка и 5-7 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и растирают до получения гомогенной суспензии. Полученную суспензию вводят 3 морским свинкам в объеме 1 мл подкожно в область бедра (II пассаж).

Наблюдение за животными осуществляют в течение 5-7 сут. Павших животных вскрывают, соблюдая правила асептики, выделяют селезенку и методом отпечатков стерильными деревянными палочками производят посев в чашки Петри с рыбно-дрожжевым цистиновым агаром или FT-агаром. Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °C в течение 48 ± 1 ч (I пассаж).

Далее посеvy просматривают, отмечают характера роста культуры, изучают морфологию микробных клеток в мазках по Граму и подтверждают подлинность с использованием набора реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные».

1.2. Культивирование тест-штамма *F. tularensis* 503/840 на питательных средах.

Культуру тест-штамма, полученную от животных, пересевают на чашки Петри с питательной средой Мак-Коя или FT - агара и инкубируют посеvy в тех же условиях (II пассаж). Затем выросшую культуру суспендируют с помощью бактериологической петли в пробирке с 5-7 мл

0,9 % раствора натрия хлорида до получения концентрации по ФСО мутности бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. Оставшиеся чашки помещают в холодильник при температуре 4 ± 2 °С и используют в случае необходимости для получения культуры тест-штамма в течение 10 сут с момента окончания выращивания на питательной среде.

Полученную микробную взвесь высевают на скошенные во флаконе питательные среды рыбно-дрожжевой цистиновый агар или FT-агар. Флаконы с посевами выдерживают при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ± 1 ч. Посевы проверяют на характер роста культуры и отсутствия посторонней микрофлоры и смывают средой высушивания (см. раздел 6). Микробную взвесь из всех флаконов объединяют в одну стерильную емкость (флакон или колба), тщательно перемешивают и определяют общую концентрацию микробных клеток. Микробная взвесь не должна содержать посторонней микрофлоры по результатам микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

При соответствии требованиям, микробную взвесь разливают в ампулы в объеме 1 мл, лиофилизируют и запаивают в соответствии с установленными требованиями.

1.3. Изучение тест-штамма *F. tularensis* 503/840 после лиофилизации.

Изучение тест-штамма *F. tularensis* 503/840 II группы патогенности после лиофилизации проводят с соответствии с подразделами, изложенными в разделе 7 по показателям: описание, время растворения, отсутствия посторонних микроорганизмов и грибов, определение концентрации микробных клеток, культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства.

1.4. Определение вирулентности тест-штамма *F. tularensis* 503/840.

Культура тест-штамма должна быть вирулентной для белых мышей, выраженной в LD₅₀. Двухсуточную культуру тест-штамма II пассажа с питательной среды Мак-Коя или FT-агара суспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида до концентрации 5×10^9 м.к./мл по ФСО мутности

бактериальной взвеси, равной 10 МЕ. Далее микробную взвесь разводят десятикратно 0,9 % раствором натрия хлорида от 10^{-1} до 10^{-9} и из разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} (концентрации 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 и 5 м.к./мл) вводят в объеме 0,5 мл подкожно в заднюю правую лапку белым мышам массой $19 \pm 1,0$ г. На каждое разведение используют по 10 белых мышей, всего в испытание используют 70 животных. Культуру тест-штамма вводят животным одним шприцем, начиная с наименьшей дозы.

Гибель белых мышей учитывают в сроки от 3 до 10 сут после инфицирования тест-штаммом. Павших животных вскрывают по общепринятой методике, отмечают патологоанатомические изменения, характерные для туляремии (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Соблюдая правило асептики, делают продольный срез селезенки и методом отпечатков высевают на питательную среду Мак-Коя или FT-агар. Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °C в течение 10 сут и ежедневно просматривают.

Гибель белых мышей от изучаемого штамма устанавливают на основании патологоанатомических данных вскрытия (плотный инфильтрат на месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки) и бактериологическим исследованием.

Величину LD_{50} определяют по формуле:

$$\lg ID_{50} LD_{50} = \lg D - 1 (\sum Li - 0,5),$$

где D - максимальная из испытываемых доз,

Li- отношение числа животных, павших при введении данной дозы к общему числу животных, которым эта доза была введена,

$\sum Li$ - сумма значений Li, найденных для всех испытываемых доз.

2. Хранение. Срок годности

Культуру вирулентного тест-штамма *F. tularensis* 503/840 сохраняют в лиофилизированном состоянии в течение 10 лет при температуре от 2 до 8 °С в Государственной коллекции патогенных бактерий I-II групп патогенности ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

3. Требования безопасности

Работа проводят в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».