Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба

Методические указания
МУ 3.3.1.2161—07

Издание официальное

Москва • 2007

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба

Методические указания
МУ 3.3.1.2161—07

ББК 51.9
О72

О72 **Основные** требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.—51 с.

ISBN 5—7508—0682—0

1. Разработаны: ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» (Н. В. Медуницын, Л. В. Саяпина, Т. И. Анисимова, Г. В. Адамова, И. С. Барулина); Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии РАМН РФ им. Н. Ф. Гамалеи (И. С. Мещерякова, М. И. Кормилицына); ФГУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (В. В. Кутырев, Т. Н. Щуковская, И. В. Исупов, С. А. Бугоркова, В. В. Фирстова); ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (И. А. Дятлов, В. М. Павлов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Роспотребнадзора (протокол № 4 от 26 декабря 2006 г.).

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 12 февраля 2007 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

ISBN 5—7508—0682—0

© Роспотребнадзор, 2007
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Введение 5
4. Общие положения 6
5. Идентификация испытуемого вакцинного штамма по видовым признакам 7
6. Определение остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на белых мышах 9
7. Определение остаточной вирулентности и безвредности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках 9
8. Определение реактогенности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках (прижизненные наблюдения) 11
9. Определение безвредности и остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках по морфологическим показателям 11
10. Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках 19
11. Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему морских свинок 19
12. Прививаемость и иммуногенная активность испытуемого вакцинного штамма 21
13. Испытание стабильности испытуемого вакцинного штамма в производственных условиях 22
14. Заключение 23
Приложение 1. Идентификация испытуемого вакцинного штамма по видовым признакам 24
Приложение 2. Определение остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на белых мышах 28
Приложение 3. Определение остаточной вирулентности и безвредности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках 30
Приложение 4 Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках 35
Приложение 5. Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему морских свинок 36
Приложение 6. Определение прививаемости испытуемого вакцинного штамма 47
Приложение 7. Определение иммуногенной активности испытуемого вакцинного штамма 48

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
12 февраля 2007 г.
Дата введения: 1 апреля 2007 г.

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба

Методические указания МУ 3.3.1.2161—07

1. Область применения

Методические указания «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба» являются руководящим документом для Государственных комиссий, проводящих доклинические Государственные приемочные испытания новых вакцинных штаммов туляремийного микроба и специалистов научно-исследовательских учреждений, осуществляющих разработку и контроль вакцинных штаммов.

2. Нормативные ссылки

2.1. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан.

2.2. РД 42-28-10—90. «Порядок и методы контроля иммунологической безопасности вакцин. Общие методические принципы».

2.3. РД 42-281—91 «Государственные приемочные испытания МИБП. Порядок проведения. Основные положения».

2.4. Приложение 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации № 125 от 14.04.99 «Об усилении мероприятий по профилактике туляремии».

2.5. СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

2.6. СП 3.3.2.561—96 «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов».

2.7. СП 1.2.036—01 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

2.8. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.9. Медицинские лабораторные технологии. Справочник С.Пб., 2000.

2.10. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

2.11. МУ 3.1.2007—05 «Эпидемиологический надзор за туляремией».

3. Введение

Возбудитель туляремии по национальной классификации относится к микроорганизмам II группы патогенности. В России для специфической профилактики туляремии используют вакцину живую сухую, приготовленную из вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Потенциально-вакцинные штаммы туляремийного микроба должны соответствовать строгим требованиям безопасности и специфической активности. Основной задачей настоящих методических указаний является изложение обязательных требований к штаммам туляремийного микроба – кандидатам в вакцинные, критериев оценки и методов исследования, основанных на информативных, хорошо изученных и широко применяемых, официально утвержденных тестах, позволяющих отобрать для последующих клинических испытаний безопасные и высоко иммуногенные штаммы туляремийного микроба.

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации разрешает проведение на добровольцах клинических ограниченных, затем государственных испытаний вакцины из штамма – кандидата в вакцинные, на основании результатов государственных лабораторных (доклинических) испытаний о соответствии нового штамма *F. tularensis* требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам, изложенными в данных методических указаниях, а также одобренными Национальным органом контроля (ГИСК им. Л. А. Тарасевича) и Комитетом медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Клинические испытания проводятся по программе, согласованной с ГИСК им. Л. А. Тарасевича и Комитетом МИБП. После утверждения Министерством здравоохранения и социального развития испытуемого штамма в качестве нового вакцинного, дальнейшие этапы внедрения

живой вакцины проводят в соответствии с СП 3.3.2.561—96 «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов».

Соблюдение настоящих методических указаний обязательно для всех учреждений, независимо от их ведомственной принадлежности.

4. Общие положения

4.1. Для изготовления живой туляремийной вакцины применяют штамм туляремийного микроба 15 НИИЭГ голарктического подвида, стабильно утратившего способность вызывать заболевание у людей и лабораторных животных, неспособного реверсировать в вирулентное состояние, но сохранившего остаточную вирулентность для белых мышей и морских свинок, обеспечивающую ему способность приживаться и вызывать иммунобиологическую перестройку в организме.

4.2. Все исследования со штаммами туляремийного микроба, перспективными для отбора в качестве кандидатов в вакцинные, должны проводиться в «заразной» зоне лабораторий (СП 1.3.1285—03, п. 2.3.6) в отдельном микробиологическом боксе, где в период испытаний не хранят и не работают с ПБА (патогенными биологическими агентами) I—IV групп патогенности. Отобранные авторами штаммы, соответствующие настоящим методическим указаниям, переводят в III группу патогенности согласно «Классификации патогенных для человека микроорганизмов» (СП 1.2.036—95, прилож. 5.4). Лиофилизацию культур штаммов, кандидатов в вакцинные для государственных испытаний, проводят в помещении и на оборудовании, предназначенных для лиофилизации только экспериментальных препаратов, изолированных от помещений, предназначенных для хранения вакцинных штаммов и изготовления живых коммерческих вакцин.

4.3. Лиофилизированные в ампулах культуры штаммов, кандидатов в вакцинные (не менее 50 ампул), вместе с отчетом о доклинических испытаниях разработчики (учреждения – авторы) передают в Государственную коллекцию патогенных бактерий (ГКПБ) РосНИПЧИ «Микроб» для организации проведения государственных испытаний. Штаммы-кандидаты в вакцинные до завершения всех испытаний (доклинических и клинических) хранят в отдельном холодильнике в помещении лаборатории ГКПБ, где не работают с ПБА. С момента начала доклинических государственных испытаний штаммы должны быть опечатаны двумя печатями: председателя государственной комиссии (или заместителя председателя) и представителя ГКПБ «Микроб» (ответственного за хранение). После завершения доклинических и клинических испытаний и признания штамма вакцинным (приказ Министерства здравоохране-

ния и социального развития Российской Федерации) оставшиеся опечатанные ампулы должны быть переданы в Государственную коллекцию ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

4.4. Работу с зашифрованными испытуемым и контрольным штаммом *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ проводят как с микроорганизмами III группы патогенности (СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами»).

4.5. Испытуемый и контрольный вакцинный штамм 15 НИИЭГ должны быть зашифрованы специалистами, не принимающими участия в проведении испытаний.

4.6. Концентрацию клеток в микробных взвесях культур определяют по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85П) 10 единиц, соответствующего года выпуска, эквивалентных 5×10^9 микробных клеток в 1 мл *Francisella tularensis*.

5. Идентификация испытуемого вакцинного штамма по видовым признакам

Идентификацию испытуемого вакцинного штамма осуществляют на основании следующих признаков: 1) морфологии и окраски бактерий в мазках и специфического свечения в РИФ (прямой реакции иммунофлуоресценции); 2) характере роста на питательной среде Мак-Коя; 3) отсутствие роста на простых питательных средах типа мясопептонного агара (МПА), агара Хоттингера; 4) биохимических свойств, характерных для представителя соответствующего подвида *F. tularensis,* 5) агглютинации диагностической туляремийной сывороткой для РА; 6) полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами, специфичными для вида *F. tularensis*, 7) ПЦР с праймерами, специфичными для потенциального вакцинного штамма.

5.1. Туляремийный микроб относится к роду *Francisella*, виду *tularensis*. Внутри вида *F. tularensis* различают три подвида – голарктический, неарктический и среднеазиатский. Туляремийные микробы – размером 0,2—0,7 мкм, неподвижные, грамотрицательные, с выраженным полиморфизмом (от кокковидных до палочковидных форм), жгутиков не имеют, образуют капсулу слизистой консистенции, при окраске мазков по Граму окрашиваются фуксином. В мазках с плотных питательных сред преобладают кокковидные формы, в мазках из органов животных преобладают коккобактерии. Слабо воспринимают красители и окрашиваются бледнее, чем прочие микроорганизмы.

5.2. *F. tularensis* – факультативный анаэроб, не растет на простых питательных средах типа мясопептонного агара или бульона; растет слабо или не растет на средах, необогащенных кровью, ее фракциями

или желтком куриных яиц. Температурный оптимум для развития характерного S или SR – типа колоний – 36—37 °С. На свернутой желточной среде Мак-Коя растет в виде извилистого, слегка блестящего, почти бесцветного налета, на питательном FT – агаре (ФСП 42-01811372—01) образует беловато-серые колонии диаметром не менее 1 мм, круглые, с ровным краем, выпуклые и блестящие. При разреженном посеве они достигают диаметра 2 мм и более, рост становится заметным через 2—3 сут. культивирования. В зависимости от используемой жидкой питательной среды туляремийный микроб может расти как на поверхности в виде пленки, так и вызывать диффузное помутнение бульона.

5.3. Туляремийный микроб расщепляет с образованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, мальтозу, маннозу, образуют сероводород, не выделяют индол. Штаммы неарктического и среднеазиатского подвидов ферментируют глицерин и цитруллин, обладают фосфатазной активностью, чувствительны к эритромицину. Неарктический подвид обладает пенициллиназной активностью, вирулентен для кроликов, среднеазиатский подвид – пенициллиназной активностью и вирулентностью для кроликов не обладает. Штаммы голарктического подвида не ферментируют глицерин (за исключением японского биовара) и цитруллин, обладают пенициллиназной активностью, не обладают – фосфатазной, по чувствительности к эритромицину разделяются на два биовара: Ery^S (высокочувствительный) и Ery^I (резистентный).

Таблица 1

Характеристика подвидов *F. tularensis*

Признак	Подвид		
	голарктический	неарктический	среднеазиатский
Ферментация глюкозы	+	+	+
Ферментация мальтозы	+	+	+
Ферментация маннозы	+	+	+
Ферментация левулезы	+	+	+
Ферментация глицерина	-	+	+
Образование сероводорода	+	+	+
Образование индола	-	-	-
Ферментация цитруллина	-	+	+
Фосфатазная активность	-	+	-
Пенициллиназная активность	+	+	-
Чувствительность к эритромицину	±	+	+
Вирулентность для кроликов	-	+	-

Примечание: (+) наличие, (-) отсутствие признака.

5.4. Штаммы туляремийного микроба, предлагаемые в качестве вакцинных, должны:

• обладать типичными культурально-морфологическими, биохимическими и антигенными свойствами, характерными для представителя соответствующего подвида *F. tularensis*;

• содержать не менее 80 % иммуногенных (SR-тип) колоний;

• должны агглютинироваться до титра сыворотки с образованием крупнохлопчатого агглютината отраслевым стандартным образцом (ОСО 42-28-28—84П) сыворотки диагностической туляремийной агглютинирующей для РА сухой;

• должно обнаруживаться специфическое свечение при окрашивании культур иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремийными сухими (ФСП-42-0181-5315—04);

• должны выявляться в ПЦР при использовании специфических праймеров.

Методики определения видовых признаков испытуемого и контрольного штаммов туляремийного микроба приведены в прилож. 1 к приказу Министерства здравоохранения РФ № 125 от 14.04.99. «Об усилении мероприятий по профилактике туляремии», прилож. 1 к настоящим методическим указаниям и МУ 3.1.2007—05 «Эпидемиологический надзор за туляремией».

6. Определение степени остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на белых мышах

LD_{50} вакцинного штамма для белых мышей должна быть в пределах от 1×10^2 до 2×10^6 м.к. *F. tularensis*. Методика определения остаточной вирулентности испытуемого и контрольного штаммов на белых мышах приведена в прилож. 2.

7. Определение степени остаточной вирулентности и безвредности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках

О безвредности культуры испытуемого штамма судят по реакции организма морских свинок на ее введение, по приживаемости и распространению бактерий в организме, по выявленным у подопытных морских свинок патоморфологическим изменениям, степени их выраженности и обратимости. В качестве контроля в этих экспериментах используют группу морских свинок, привитых культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и обследуемых аналогичным образом. Методики

определения безвредности нового вакцинного штамма приведены в прилож. 3.

7.1. Испытание вакцинного штамма *F. tularensis* проводят на морских свинках массой 400—500 г. Наблюдение за животными проводят 30 сут. Испытуемый и вакцинный штаммы туляремийного микроба 15 НИИЭГ не должны вызывать гибель морских свинок, привитых дозами 5×10^3, 5×10^5, 5×10^7 и 5×10^9м.к./мл.

7.2. Вакцинные штаммы туляремийного микроба должны обладать определенной степенью остаточной вирулентности, т. е. в течение некоторого времени размножаться, распространяться и задерживаться в организме привитых животных и вызывать доброкачественный вакцинальный процесс. Бактерии вакцинных высокоиммуногенных штаммов *F. tularensis* должны размножаться в организме привитых морских свинок в течение первых 3—15 сут., обусловливая тем самым иммунологическую перестройку организма. Через 30 сут. организм морских свинок, как правило, освобождается от микробов. Бактерии вакцинных штаммов *F. tularensis* должны приживаться в организме морских свинок и выявляться в высевах из мест введения и из регионарных лимфатических узлов в течение 20—30 сут., из селезенки и печени в течение первых 10—15 сут.

7.3. Для вакцинного штамма туляремийного микроба при подкожном методе введения допустимо выделение микробов при посеве отпечатками органов и тканей на питательную среду:

- из места введения и регионарного лимфатического узла до 20—30 сут. при дозах 5×10^7 и 5×10^9 м.к. в виде сливного (4+) или обильного роста (3+), при дозе 5×10^5 м.к. – около 100—200 колоний (2+) и при дозе 5×10^3 м.к. – до 10 и иногда более колоний (1+);
- в посевах печени и селезенки при дозах 5×10^7 и 5×10^9 м.к.. может вырастать более 100 колоний, при дозе 5×10^5 м.к. – около 50—100 колоний, от морских свинок, привитых 5×10^3 м.к. вакцинный штамм туляремийного микроба обычно не выделяется;
- в посевах из легких, крови и костного мозга, как правило, не должно быть роста туляремийных микробов. У отдельных животных в течение 3—5 сут., после введения дозы 5×10^9 м.к. исследуемой культуры в посевах из легких, крови или костного мозга могут вырастать единичные колонии *F. tularensis*.

8. Определение реактогенности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках (прижизненные наблюдения)

8.1. Высокоиммуногенный вакцинный штамм туляремийного микроба при подкожной иммунизации морских свинок должен вызывать у них допустимые местную и общую реакции. Интенсивность и продолжительность реактивных изменений у морских свинок зависит от дозы введенных вакцинных микробов и степени остаточной вирулентности изучаемого штамма. Дозы 5×10^3 м.к. не вызывают или вызывают у морских свинок незначительное повышение температуры тела и снижение массы. В течение 7—10 сут. в месте введения могут пальпироваться ограниченные очаги уплотнения мягких тканей, регионарные лимфатические узлы могут быть не увеличены или увеличены, но должны быть подвижными, т. е. не спаянными с окружающими мягкими тканями.

8.2. При подкожном введении 5×10^9 м.к. у отдельных животных возможно повышение температуры тела на 1,5—2 °С. Среднее повышение температуры тела для группы морских свинок (30 голов), которым было введено 5×10^3, 5×10^5, 5×10^7 и 5×10^9 м.к. исследуемого штамма, не должно превышать 1 °С. К 7—12 сут. после введения вакцинного штамма температура тела морских свинок должна снизиться до исходных значений.

8.3. В ответ на введение вакцинного штамма туляремийного микроба в дозе 5×10^9 м.к. в первые 5 сут. может снижаться масса тела морских свинок. К 6—7-м сут. после введения испытуемой культуры снижение массы животных не должно превышать $^1/_5$ ее первоначальной величины. У половины опытных животных допустимо развитие обширных отеков в месте введения культуры, у отдельных – увеличение, уплотнение лимфатических узлов и спаянность их с мягкими тканями.

Методика определения реактогенности вакцинного штамма для морских свинок приведена в прилож. 3.

9. Определение безвредности и остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках по морфологическим показателям

Безвредность испытуемых штаммов туляремийного микроба по морфологическим показателям определяется в экспериментах на морских свинках при подкожном способе введения.

Степень остаточной вирулентности испытуемого штамма характеризуют специфические для вакцинального процесса морфологические (макроскопические и гистологические) изменения, возникающие

у морских свинок в тканях места введения культуры, в регионарных, контрлатеральных и отдаленных лимфатических узлах, а также во внутренних органах (печень, селезенка, легкие, почки с надпочечниками, сердце). Методика вскрытия и исследования морских свинок приведена в прилож. 3.

9.1. Испытуемый штамм туляремийного микроба не может быть признан вакцинным, если он в соответствующих дозах при всех равных условиях чаще вызывает у морских свинок более выраженные изменения (см. ниже), чем контрольный вакцинный штамм 15 НИИЭГ.

9.1.1. Испытуемый штамм, введенный морским свинкам в дозах 5×10^7 и 5×10^9 м.к., вызывает максимальное развитие островоспалительных изменений примерно к 7-м сут., их стихание с преобладанием продуктивного компонента – к 14-м сут. и полную резорбцию или заживление без грубых рубцовых изменений – к концу 30-х сут.

9.1.2. При введении культуры в дозе 5×10^3 м.к. сроки нарастания островоспалительных изменений могут затягиваться до 14 сут., а их стихание до 21—28 сут.

9.2. При введении морским свинкам культуры безвредного вакцинного штамма допустимы перечисленные ниже изменения.

9.2.1. Место введения

Макроскопическая картина. При введении культуры вакцинного штамма в дозах 5×10^3, 5×10^5 и 5×10^7 м.к. допустимо: незначительное или умеренное диффузное или очаговое полнокровие сосудов тканей в остром периоде процесса. При введении культуры в дозе 5×10^9 м.к. преимущественно в остром периоде (5—10-е сут.) не более, чем в половине случаев, допустимы: участки воспалительного уплотнения (инфильтраты) размерами до 1,0 × 1,5 см, в единичных случаях более крупные; серозный отек мягких тканей бедра и паховой области в месте введения культуры, но без его распространения на прилежащие участки (брюшная и грудная стенка, контрлатеральная паховая область), гнойные очаги и кровоизлияния диаметром до 0,5 см в диаметре. В единичных случаях (не более 3 животных) допустимы: крупные кровоизлияния до 1,5 см в диаметре; очаги некроза до 0,5—0,7 см в диаметре; инкапсулированные абсцессы с гнойной полостью до 0,5 см в диаметре; язвы и свищи с гнойным отделяемым. К 14—21-м сут. воспалительные изменения стихают. К 30-м сут. у отдельных животных допустимы: незначительные остаточные явления в виде небольших рубцовых изменений.

При введении испытуемой культуры в дозах 5×10^5 и 5×10^7 м.к. не более, чем у 1—3 свинок допустимы: участки воспалительного уплотнения (инфильтраты) размерами не более 0,5—0,7 см; умеренный

серозный отек тканей бедра и паховой области со стороны введения испытуемого штамма; мелкие (менее 0,3 см в диаметре) очаги гнойного воспаления; кровоизлияния до 0,5 см в диаметре.

При введении испытуемой культуры в дозе 5×10^3 м.к. допустимы изменения по частоте, которые наблюдаются при введении контрольного вакцинного штамма 15 НИИЭГ (п. 8.1).

Следует обращать внимание на возможность возникновения инкапсулированных абсцессов в тканях места введения в поздние сроки (до 45 сут.). Такие изменения характерны для недостаточно аттенуированных штаммов.

Гистологические изменения. Наблюдается воспаление собственно кожи, подкожной клетчатки с явлениями некробиоза, небольшими участками кровоизлияний и серозным пропитыванием прилежащих структур. При введении культуры исследуемого штамма во всех указанных дозах допустимы: в ранние сроки (3—5-е сут.) гнойное воспаление – инфильтраты из полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМН-лейкоцитов); с 7-х по 10-е сут. по периферии очага гнойного расплавления развивается продуктивная реакция – участки грануляционной ткани, которые к 14—21-м сут. постепенно замещают очаг воспаления соединительной тканью. В этот период возможно обнаружение преимущественно эпителиоидно-клеточных гранулем с наличием многоядерных гигантских клеток. В некоторых гранулемах могут быть небольшие очаги некроза в центре; к 28—45-м сут. происходит полное замещение очага воспаления соединительной тканью.

При введении культуры исследуемого штамма в меньших дозах указанные изменения могут наблюдаться не более чем у 2—3 свинок.

9.2.2. Регионарные лимфатические узлы (паховые и подвздошные)

Макроскопическая картина. При введении культуры испытуемого штамма в максимальной дозе (5×10^9м.к.) допустимо: умеренное увеличение регионарных лимфатических узлов к 3 сут. в 1,5—2,0 раза; отек окружающей клетчатки с единичными мелкопятнистыми кровоизлияниями. На 5-е сут. лимфатические узлы полнокровны, иногда с мелкими кровоизлияниями в капсулу и окружающую клетчатку. К 7—14-м сут. лимфатические узлы увеличиваются значительно (в 2,5 раза), окружающая их клетчатка полнокровна, отечна, с наличием кровоизлияний (0,3—0,5 см в диаметре). Увеличение лимфатических узлов продолжается до 28-х сут.

При введении культуры испытуемого штамма в меньших дозах допустимо: с 3-х по 14-е сут. незначительное или умеренное (до 0,5 см в диаметре) увеличение узлов, с гиперемией и уплотнением, без геморра-

гий, очагов нагноения и некрозов. Выраженность качественных и количественных изменений прямо пропорциональна величине дозы вводимого испытуемого штамма.

Гистологические изменения. При введении культуры исследуемого штамма в дозе 5×10^9 м.к. уже на 3-е сут. в корковом слое под капсулой образуются специфические гранулемы различной величины и формы. Они состоят из полиморфно расположенных эпителиоидных клеток, среди которых обнаруживаются и гигантские многоядерные клетки. Обычно в центре гранулем имеются скопления полиморфно-ядерных лейкоцитов, часть из которых с распадающимися ядрами. В мозговом слое отмечается выраженное полнокровие и катар синусов. В последующие сроки формирование гранулем продолжается. К этим изменениям на 7-е сут. присоединяются явления продуктивного периаденита; начинается постепенное замещение гранулем соединительной тканью, некоторые гранулемы в центре подвергаются некрозу. В последующие сроки (10—14-е сут.) воспалительные изменения могут распространяться и вызывать образование довольно обширных периаденитов. К 21-м сут. отмечается формирование свежих гранулематозных образований; выявляются склеротические процессы, особенно в мозговом веществе; сохраняется продуктивный периаденит. Склеротические изменения наблюдаются и в более поздние сроки (до 45-х сут.). Введение испытуемого штамма в меньших дозах сопровождается, соответственно дозе, менее выраженными изменениями. При введении всех указанных доз у животных допустимы: острый серозный (негнойный) лимфаденит со слабо выраженным периаденитом без некротических изменений; подострый лимфаденит с участками грануляционной ткани, с продуктивными изменениями, частичным фиброзом, изредка с небольшими рассасывающимися гранулемами без очагов некроза и нагноения, в половине случаев при введении культуры в дозе 5×10^7 м.к. и у отдельных животных при введении испытуемого штамма в дозе 5×10^3 м.к.

9.2.3. Контрлатеральные и отдаленные лимфатические узлы

Макроскопическая картина. При введении культуры испытуемого штамма во всех указанных дозах допустимо: умеренное или незначительное (до 0,5 см) увеличение лимфатических узлов без признаков острых воспалительных изменений. Кроме того, при введении культуры в дозе 5×10^9 м.к. возможно в отдельных случаях уплотнение лимфатических узлов с проявлением умеренной гиперемии кожных покровов.

Гистологические изменения. При введении культуры во всех указанных дозах допустимы: гиперпластические изменения в лимфоидной ткани разной степени выраженности; умеренно или незначительно вы-

раженный очаговый серозный лимфаденит, небольшие участки продуктивных изменений и фиброза стромы узлов.

9.2.4. Селезенка

Макроскопическая картина. При введении исследуемых культур в дозе 5×10^9 м.к. уже на 3-и сут. селезенка бывает увеличена, умеренно полнокровна; в последующие сроки могут наблюдаться очень мелкие очажки серовато-белого цвета, бесследно исчезающие к 10—14-м сут. Испытуемый штамм, вводимый в дозах 5×10^7 и 5×10^5 м.к., вызывает значительно меньшие макроскопические изменения.

Во всех указанных дозах допустимы: небольшое или умеренное (в 1,5—2 раза) увеличение размеров селезенки с умеренным полнокровием при отсутствии значительного соскоба на разрезе (чрезмерно сочные отпечатки при посевах). В половине случаев при введении культуры в дозе 5×10^9 м.к., у 30 % животных при введении культуры в дозе 5×10^7 м.к., могут быть признаки гиперплазии фолликулов (выбухание под капсулой). При введении культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: у отдельных морских свинок (не более 6) развитие единичных или немногочисленных (не более 10 в органе), преимущественно субмиллиарных или отдельных миллиарных узелков серовато-белого, иногда розоватого цвета без признаков некротизации, абсцедирования, без слияния в более крупные очаги, без инкапсуляции и грубого рубцевания, полностью разрешающихся к 45-м сут.; при введении исследуемой культуры в дозах 5×10^7 и 5×10^5 м.к. возможно у отдельных животных (1—2) развитие единичных узелков (1—3) без признаков некротизации, без абсцедирования, без слияния в более крупные очаги, без инкапсуляции и грубого рубцевания, полностью разрешающиеся к 45-м сут. При введении меньшей дозы таких изменений не должно быть.

Гистологические изменения. При введении испытуемого штамма во всех указанных дозах допустимы: гиперплазия клеток белой пульпы (фолликулов и периартериальных муфт), плазмоклеточная реакция разной степени выраженности; полнокровие синусов селезенки; острый серозный очаговый или диффузный спленит, стихающий в поздние сроки, наличие лимфогистиоцитарных инфильтратов в строме, небольших участков грануляционной ткани, небольших очагов фиброза в строме и капсуле органа при введении испытуемых культур в дозах 5×10^9 и 5×10^7 м.к. – у 50 % животных, а в дозах 5×10^5 и 5×10^3 м.к. – у отдельных (3—5) животных. Кроме того, при введении исследуемой культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: гранулемы единичные (1—2 в срезе), эпителиоидно-клеточные, без очагов некроза и явного абсцедирования, без грубого рубцевания по периферии, иногда с небольшим накоп-

лением полиморфно-ядерных лейкоцитов (псевдоабсцесс) при процессах резорбции не более, чем у 5—6 опытных животных; при введении исследуемой культуры в дозе 5×10^7 м.к. допустимы у отдельных животных единичные, мелкие гранулемы (1—2 в срезе) продуктивного характера.

9.2.5. Печень

Макроскопическая картина. При введении исследуемой культуры во всех указанных дозах допустимы: признаки умеренных диффузных дистрофических изменений органа (незначительное увеличение размеров, набухание, сероватый оттенок окраски); венозное полнокровие; у единичных (1—2 свинки) животных возможно развитие узелков (до 3 в органе), преимущественно точечных без признаков некроза, нагноения и грубого рубцевания; беловатых или сероватых точечных и штрихообразных очагов.

При введении исследуемой культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: у отдельных животных (не более 6) немногочисленные (до 10 в органе) преимущественно точечные и субмилиарные, редко милиарные узелки без признаков некротизации, без абсцедирования, инкапсуляции и грубых рубцовых изменений ткани печени в поздние сроки, иногда с небольшими втяжениями поверхности; при введении исследуемой культуры в дозе 5×10^7 м.к. у единичных (1—3) животных возможно развитие точечных и субмилиарных узелков без признаков некротизации, без абсцедирования, без инкапсуляции и грубых рубцовых изменений ткани органа.

Гистологические изменения. При введении исследуемой культуры во всех указанных дозах у 50 % животных допустимы: наличие умеренно выраженных признаков функционального напряжения гепатоцитов («зернистая дистрофия»), умеренно выраженные очаговые вакуольная и (или) жировая дистрофии; мелкие единичные (2—3 в срезе) лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме.

При введении испытуемой культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: гранулемы эпителиоидно-клеточные без фокусов некроза, абсцедирования, инкапсуляции выраженных склеротических очагов, с признаками резорбции, не более, чем у 6 животных; единичные (1—3 в срезе) очаги некроза и некробиоза в пределах 10—15 печеночных клеток при наличии хорошо выраженной продуктивной клеточной реакции без склонности к дальнейшей некротизации и к абсцедированию не более, чем у 1—2 свинок. При введении исследуемой культуры в дозе 5×10^7 м.к. возможно развитие единичных (1—2 в срезе) гранулем не более, чем у 1—2-х животных. При введении исследуемой культуры в дозе 5×10^5 м.к. и

5×10^3 м.к. допустимо развитие лишь единичных (1—2 в срезе) продуктивных гранулем у отдельных (1—2) животных.

9.2.6. Легкие

Макроскопическая картина. При введении исследуемой культуры во всех дозах допустимы: участки неравномерного полнокровия легких; участки пониженной воздушности серовато-синюшного цвета.

При введении исследуемой культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: милиарные и субмилиарные очаги уплотнения легочной ткани серовато-розоватого, иногда синюшно-красного цвета, немногочисленные (до 10 в обоих легких) в половине случаев при отсутствии бактериологического выделения возбудителя туляремии из ткани легких; при введении исследуемой культуры в дозах 5×10^7 и 5×10^5 м.к. возможно развитие единичных (1—3) милиарных и субмилиарных очагов уплотнения легочной ткани у отдельных (1—3) свинок при отсутствии позитивных бактериологических данных.

Гистологические изменения. При введении всех указанных доз допустимы: признаки умеренной очаговой интерстициальной инфильтрации перегородок между альвеолами лимфоидными и гистиоцитарными клеточными элементами при отсутствии сужения просветов альвеол, кровоизлияний, значительной примеси в инфильтрате ПМН-лейкоцитов, гиперплазии бронхопульмонарных лимфатических узелков, крупных лимфогистиоцитарных инфильтратов вокруг сосудов и бронхов. При введении испытуемой культуры в дозе 5×10^9 м.к. допустимы: вышеописанные изменения преимущественно гиперпластические – типа интерстициальной реакции распространенного или диффузного характера с участием бронхопульмональных лимфатических узелков, наличием лимфогистиоцитарных инфильтратов умеренных размеров вокруг сосудов и бронхов.

9.2.7. В других органах (сердце, почки, надпочечники) допустимы гиперпластические и умеренные дистрофические изменения в пределах, наблюдаемых при обычном вакцинном процессе после введения культуры вакцинного штамма туляремийного микроба 15 НИИЭГ.

9.3. Все вышеотмеченные изменения, допустимые при развитии вакцинальной реакции, могут колебаться в известных пределах у отдельных морских свинок по выраженности, срокам развития и полноте резорбции. Оценка изменений в месте введения культуры и в лимфатических узлах в смысле их допустимости как вакцинальных не представляет трудности. В противоположность этому дать правильную оценку изменениям во внутренних органах, укладывающимся в пределы вакцинальных реакций, очень сложно. Возникают затруднения даже при под-

счете числа узелков в печени и селезенке. Иногда количество узелков может быть решающим в оценке испытуемых культур. Наличие 12—15 узелков в печени и селезенке у 1—2 морских свинок, которым испытуемая культура была введена в дозе 5×10^9 м.к. при отсутствии других недопустимых изменений не может быть абсолютным показателем для ее отклонения.

Отсутствие или слабая выраженность дистрофических процессов в паренхиматозных органах, отсутствие роста испытуемого штамма туляремийного микроба в посевах из этих органов наряду с другими позитивными характеристиками штамма указывают на безвредность последнего, несмотря на несколько большую узелковую реакцию. В то же время единичные узелки (2—5 в органе), заканчивающиеся формированием абсцессов и рубцов, приводящие к нарушению структуры органа, могут быть показателем высокой степени остаточной вирулентности изучаемой культуры, и на основании этого штамм может быть поставлен под сомнение как соответствующий вакцинному.

Наиболее важное значение имеет качество узелков: их характер, развитие и исходы. Узелки должны развиваться в острой, нестерильной фазе поствакцинальной реакции, иметь продуктивный характер. В период резорбции приобретать строение псевдоабсцессов и рассасываться к 30-м сут. наблюдения, когда наступает полное восстановление структуры органов.

Чаще формирование узелков в печени и селезенке сочетается с выраженными местными изменениями. Однако в ряде случаев узелки обнаруживаются у морских свинок, у которых в месте введения культуры и регионарных лимфатических узлах изменения минимальные. Испытуемые штаммы, вводимые в максимальной дозе, могут сохранять токсигенные свойства, проявляющиеся образованием очагов некробиоза печени.

9.4. Недопустимо: при подкожном введении испытуемого штамма, даже в максимальной дозе (5×10^9 м.к.), развитие в месте введения обширных кровоизлияний в подкожной клетчатке с выраженным отеком, гнойным расплавлением или некрозом тканей; в регионарных лимфатических узлах – диффузного гнойного аденита и периаденита с видимыми участками некроза; в легких – сливных очагов интерстициальной пневмонии или микроскопических очагов серозной, серозно-геморрагической и серозно-десквамативной пневмонии с выделением из легких испытуемой культуры; в печени и селезенке – множественных узелков и очагов некроза, абсцессов, обширных кровоизлияний, а в поздние сроки – рубцовых изменений.

10. Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках

10.1. В результате 10-кратного подкожного пассирования исследуемой культуры через организм морских свинок у нее не должны:

- повыситься остаточная вирулентность;
- измениться культуральные, морфологические, биохимические свойства;
- измениться антигенный состав, снизиться антигенная активность.

10.2. Вакцинный штамм туляремийного микроба в организме морских свинок не должен реверсировать в вирулентную форму, способную в организме восприимчивого животного вызывать изменения, свойственные туляремийной инфекции.

Степень приживаемости микробов в организме может усилиться.

Методика проведения пассажей испытуемого вакцинного штамма на морских свинках приведена в прилож. 4.

11. Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему морских свинок

Цель проведения испытания заключается в выявлении возможных иммунологических нарушений в организме после введения культуры исследуемого штамма. Нарушения иммунной системы могут приводить к развитию вторичного иммунодефицита, быть причиной изменений иммунной реактивности организма на другие неродственные антигены, лежать в основе неполноценного специфического ответа на сам штамм.

Введение испытуемого штамма туляремийного микроба не должно приводить к нарушению иммунологического гомеостаза организма, т. е. испытуемый штамм не должен статистически достоверно снижать усредненные иммунологические показатели, по сравнению с их величинами в контрольной группе.

Методы исследования влияния штамма на иммунную систему приведены в прилож. 5.

11.1. Определение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов

Испытуемый вакцинный штамм не должен вызывать статистически достоверного уменьшения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в крови морских свинок, иммунизированных подкожно дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к. Увеличение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов свидетельствует об иммунологической ак-

тивности испытуемого и контрольного штаммов туляремийного микроба. Увеличение количества Т-лимфоцитов испытуемого штамма не должно быть меньше, чем вызываемое контрольным вакцинным штаммом.

11.2. Определение относительного и абсолютного количества В-лимфоцитов

Испытуемый вакцинный штамм не должен вызывать статистически достоверного уменьшения абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов в крови морских свинок, иммунизированных подкожно дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к. Увеличение абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов свидетельствует об иммунологической активности испытуемого и контрольного штаммов туляремийного микроба. Увеличение количества В-лимфоцитов испытуемого штамма не должно быть меньше, чем вызываемое контрольным вакцинным штаммом.

11.3. Определение фагоцитарной активности макрофагов

Фагоцитарная активность определяется процентом фагоцитирующих клеток (ПФ) и фагоцитарным числом (ФЧ), которое определяется количеством микробных клеток на один фагоцит.

Вакцинный штамм туляремийного микроба не должен оказывать повреждающего действия на иммунную систему морских свинок, привитых подкожно дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к., должен стимулировать фагоцитирующие мононуклеары перитонеального экссудата – повышать процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарное число. ПФ и ФЧ не должны статистически значимо отличаться от аналогичных показателей вакцинного штамма 15 НИИЭГ.

11.4. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) спонтанная и под влиянием Т- и В-клеточных митогенов

Реакцию бласттрансформации клеток выражают в виде индекса стимуляции клеток (ИСК), представляющего собой частное от деления среднеарифметического количества импульсов в 1 мин в культурах лимфоцитов, стимулированных митогенами, на среднеарифметическое количество импульсов в 1 мин в контрольных, не стимулированных митогенами, клетках (радиометрическая метка).

Вакцинный штамм туляремийного микроба не должен оказывать повреждающего действия на иммунную систему морских свинок, привитых подкожно дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к. – не должен снижать ИСК РБТЛ; должен стимулировать функциональную активность Т- и В-лимфоцитов – вызывать статистически значимое повышение ИСК

РБТЛ. Повышение ИСК РБТЛ должно быть не меньше, чем вызываемое вакцинным штаммом 15 НИИЭГ.

11.5. Определение поликлональной активности В-лимфоцитов

Для получения этого показателя определяют число клеток, продуцирующих антитела к эритроцитам барана (АОК), методом локального гемолиза в геле в разные сроки (3, 7, 14 и 28 сут.).

Вакцинный штамм туляремийного микроба у морских свинок, привитых дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к., может вызывать повышение поликлональной активности В-лимфоцитов.

11.6. Исследование иммунореактивности на гетерологичный антиген

Проводят определение АОК к эритроцитам барана (ЭБ).

Вакцинный штамм туляремийного микроба у морских свинок, привитых дозами 5×10^3 и 5×10^4 м.к., не должен вызывать вторичное иммунодефицитное состояние – не должен снижать иммунный ответ на гетерологичный антиген.

12. Прививаемость и иммуногенная активность испытуемого вакцинного штамма

12.1. Прививаемость. Вакцинный штамм туляремийного микроба должен прививаться при накожной аппликации морским свинкам в дозах 5×10^6 и 5×10^7 м.к./мл. У всех привитых животных на 2—5-е сут. вокруг насечек должен появиться инфильтрат и гиперемия размером 0,5—1,5 см. Методика определения прививаемости изучаемого вакцинного штамма приведена в прилож. 6.

12.2. Испытуемый вакцинный штамм должен обладать иммуногенной активностью в опытах по активной защите морских свинок, определяемой в $ЕД_{50}$. Величина $ЕД_{50}$ испытуемого и контрольного штаммов не должна превышать 5×10^3 м.к. Подкожная иммунизация морских свинок испытуемым и контрольным вакцинными штаммами дозами 5, 5×10^1, 5×10^2, 5×10^3, и 5×10^4 м.к./мл должна предохранять их от гибели при подкожном инфицировании через 25—30 сут. дозой 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийного микроба голарктического подвида, 1 Dcl которого не превышает 5 м.к.

По иммуногенности испытуемый штамм считают равноценным контрольному вакцинному штамму, если его минимальный показатель $ЕД_{50}$ не более максимального показателя туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Испытуемый штамм можно считать более иммуногенным, если его максимальный показатель $ЕД_{50}$ меньше минимального показателя $ЕД_{50}$ контрольного штамма. Методика определения иммуногенности штаммов приведена в прилож. 7.

12.3. Испытуемый вакцинный штамм при подкожной иммунизации морских свинок дозой 5×10^4 м.к., инфицированных на 7-е сут. культурой вирулентного штамма туляремийного микроба дозой 1000 Dcl, должен предохранять от гибели не менее 50 % животных.

12.4. Напряженность иммунитета определяется по способности вакцинного штамма предохранять животных от гибели после заражения их вирулентным штаммом *F. tularensis,* а также индексом иммунитета. Напряженность иммунитета выражается количеством микробных клеток, при инфицировании которыми на 21-е сут. выживает более 50 % морских свинок, иммунизированных 5×10^4 м.к. испытуемым и контрольным штаммами туляремийного микроба.

Индекс иммунитета – отношение величины LD_{50}, рассчитанной для вакцинированных животных, к аналогичному показателю не иммунизированных животных.

Напряженность и индекс иммунитета испытуемого штамма не должны быть ниже, чем аналогичные показатели у контрольного вакцинного штамма. При сравнении вышеуказанных показателей учитывается только статистически достоверная разница между испытуемым и контрольным штаммами.

12.5. Испытуемый штамм туляремийного микроба, введенный подкожно морским свинкам в дозе 5×10^4 м.к., должен вызывать иммунитет, по длительности не уступающий иммунитету, создаваемому у животных при иммунизации такой же дозой туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ.

Методика определения иммуногенности штамма для морских свинок по величине ED_{50}, напряженности, срокам формирования и длительности иммунитета приведена в прилож. 7.

13. Испытание стабильности испытуемого вакцинного штамма в производственных условиях

Испытуемый штамм, удовлетворяющий по результатам доклинических испытаний требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам туляремийного микроба, следует проверить на стабильность свойств перед изготовлением вакцины в производственных условиях. Технология изготовления живой туляремийной вакцины должна быть аналогична изложенной в регламенте производства на коммерческий препарат или, при наличии особенностей культивирования, должна быть описана авторами в экспериментально-производственном регламенте.

Испытуемый вакцинный штамм туляремийного микроба в производственных условиях при глубинном культивировании в полужидкой

рыбно-дрожжевой среде в условиях аэрации должен давать максимальный выход биомассы, стабильно сохранять высокую жизнеспособность, культурально-морфологические, биохимические и иммуногенные свойства. Испытание штамма на стабильность данных свойств должно проводиться путем последовательного двукратного выращивания.

Контроль трех первых серий вакцины туляремийной живой сухой, приготовленной из нового штамма, должен проводиться в соответствии с действующей нормативной документацией на коммерческий препарат вакцины и удовлетворять изложенным в ней требованиям.

14. Заключение

Испытуемый вакцинный штамм, удовлетворяющий настоящим Методическим указаниям по всем свойствам, может быть допущен до следующего этапа внедрения – клинических испытаний на людях. На основании результатов государственных доклинических испытаний, заключений Национального органа контроля ГИСК им. Л. А. Тарасевича и Комитета медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) о соответствии испытуемого штамма *F. tularensis* требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам данными Методическими указаниями, Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации разрешает проведение на людях клинических ограниченных, а затем государственных испытаний вакцины, приготовленной на основе испытуемого штамма. Программа испытаний согласовывается с ГИСК им. Л. А. Тарасевича, Комитетом МИБП и Комитетом по этике при Федеральном органе контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств.

Испытуемый штамм туляремийного микроба, удовлетворяющий всем перечисленным требованиям, прошедший с положительным заключением государственные испытания, может быть признан как вакцинный и утверждается Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Приложение 1
(обязательное)

Идентификация испытуемого вакцинного штамма по видовым признакам

1.1. Подготовка к исследованию испытуемого и контрольного вакцинных штаммов туляремийного микроба

Ампулы с сухой культурой испытуемого и контрольного вакцинных штаммов туляремийного микроба вскрывают с соблюдением правил асептики и растворяют содержимое каждой ампулы в 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Затем засевают полученной микробной взвесью ряд пробирок со скошенной питательной средой Мак-Коя* или FT – агаром (ФСП 42-0181-1372—01) и выращивают в течение 48 ч при температуре (37 ± 1) °С – получают культуру 1 пассажа, которую пересевают аналогично, получая культуру 2 пассажа. Часть пробирок исходной культуры 1 пассажа запаивают и хранят при температуре (4 ± 1) °С на случай повторения посевов и изучения свойств. Двухсуточную культуру 2 пассажа изучают по основным культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

**Приготовление питательной среды Мак-Коя.* Свежие куриные яйца моют щеткой с мылом в теплой воде, затем кладут в 5 %-й раствор соды на 20 мин, после чего промывают теплой водой и помещают на 20 мин в 5 %-й раствор карболовой кислоты, вновь промывают водой и кладут на 20 мин в 70°этиловый спирт. Из обработанных таким образом яиц стерильно извлекают желток, тщательно отделяя его от белка, желтки сливают в стерильный градуированный сосуд и смешивают со стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,1 ± 0,1 в пропорции 60 частей желтка и 40 частей 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Желточную среду разливают в стерильные пробирки по 5—6 мл в каждую и помещают в аппарат для свертывания и инактивации сыворотки (МРТУ 42-2473—65) при температуре 80 °С на 1 ч. Готовую среду ставят на сутки в термостат при температуре (37 ± 1) °С для проверки ее стерильности. Правильно приготовленная среда должна иметь на дне пробирки конденсационную жидкость. Среду хранят при температуре 4—6 °С в течение одного месяца.

1.2. Определение культурально-морфологических свойств испытуемого штамма туляремийного микроба

Культуры испытуемого и контрольного штаммов *F. tularensis* на питательной среде Мак-Коя растут в виде извилистого, слегка блестящего, почти бесцветного налета; на FT-агаре – в виде единичных беловато-серых блестящих круглых колоний не менее 1 мм диаметром. В мазках, окрашенных по Граму, микробы имеют вид грамотрицательных полиморфных мелких кокков или овоидных палочек. Для определения степени диссоциации изучаемого штамма из двухсуточной культуры 2 пассажа готовят взвесь концентрацией 5×10^9 м.к./мл туляремийного микроба в 0,9 %-м растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности 10 единиц (ОСО 42-28—85П), разводят ее 0,9 %-м раствором натрия хлорида в 5 раз до концентрации 1×10^9 м.к./мл, затем последовательно десятикратно разводят до концентрации 1×10^3 м.к./мл. Из этого разведения делают высев культуры по 0,1 мл на 5 чашек Петри, содержащих FT-агар, и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 2—5 сут. После появления колоний чашки ставят в холодильник на 1 сут. при температуре (4 ± 1) °С, после чего подсчитывают не менее 100 колоний на каждой чашке. Не менее 80 % из подсчитанных колоний должны быть иммуногенными (SR-типа) белого цвета.

1.3. Определение биохимических свойств испытуемого вакцинного штамма туляремийного микроба

1.3.1. Для определения биохимической активности испытуемого и контрольного вакцинных штаммов используют культуры со скошенного агара 2 пассажа. Определение ферментации углеводов (сахара, спирта) проводят в специальной жидкой среде* или среде Dawns**.

* Состав и приготовление жидкой среды для определения ферментации углеводов *F. tularensis:* пептон – 1 г; натрий хлорид (NaCl) – 5 г; калий гидрофосфат (K_2HPO_4) – 0,3 г; L-цистеин гидрохлорид – 0,1 г; феноловый красный – 0,02 г; сахар – 10 г (или глицерин – 10 мл) на 1 л дистиллированной воды. Смесь подогревают до полного растворения, остужают, устанавливают pH 7,2, разливают во флаконы по 100 мл. Стерилизуют автоклавированием при 115 °С в течение 20 мин и разливают по 2 мл в пробирки. Пробирки должны быть химически чистыми и простерилизованными. Цвет среды – оранжево-красный. Культуру засевают по 1 полной бактериологической петле и инкубируют при температуре 37 °С до 5—6 сут.

В случае ферментации углевода цвет среды становится желтым, при отрицательной реакции цвет среды остается без изменений.

** Среду Dawns готовят согласно «Руководству по лабораторной диагностике туляремии» (Иркутск, 1986): 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, мальтоза, манноза, левулеза). Приготовленную среду стерилизуют при 112—115 °С в течение 20 мин, затем охлаждают до 40—50 °С и добавляют 5 % (от общего объема) нормальной лошадиной сыворотки, обязательно устанавливают pH 7,0 ± 0,1 (подкисляют соляной кислотой в разведении 1 : 1 или подщелачивают 20 %-м раствором натрия гидроксида). Цвет среды должен быть зеленым. После чего готовят скошенные столбики среды в пробирках. Культуру высевают по 2—3 полные бактериологические петли на пробирки со скошенной средой Dawns с глюкозой, мальтозой, маннозой, левулезой и глицерином. При положительной реакции цвет среды изменяется на лимонный.

1.3.2. Пробы на образование сероводорода и отсутствие выделения индола ставят в соответствии с Инструкцией по применению систем индикаторных бумажных для идентификации микроорганизмов (СИБ) – ФСП 42-0100-3827—03.

Учет результатов: испытуемый вакцинный штамм образует сероводород и не выделяет индол.

1.3.3. Определение фосфатазной активности. В 1 мл 0,5 %-го водного раствора додецилсульфата натрия готовят микробную взвесь испытуемого штамма туляремийного микроба и добавляют 1 мг фенолфталеиндифосфата. Смесь инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин и добавляют 1 каплю 1 N натрия гидроксида.

Учет результатов: испытуемый вакцинный штамм не изменяет цвет реакционной смеси.

1.3.4. Определение пенициллиназной активности. Фильтровальную бумагу, смоченную растворами бензилпенициллина (50 000 ед./мл) и крезолового красного (1мг/мл), помещают на дно чашки Петри. На поверхность бумаги наносят каплю микробной взвеси испытуемого штамма туляремийного микроба и 30 мин инкубируют при температуре 20 °С.

Учет результатов: испытуемый вакцинный штамм окрашивает пробы в желтый цвет.

1.3.5. Определение чувствительности к эритромицину. Осуществляют методом дисков по методике, изложенной в «Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» (МЗ СССР, Москва, 1983).

1.4. Определение серологических свойств испытуемого вакцинного штамма туляремийного микроба.

Серологические свойства определяют с помощью пробирочной реакции агглютинации. Реакцию агглютинации испытуемого штамма ставят в соответствии с Инструкцией по применению сыворотки диагностической туляремийной агглютинирующей по ФС 42-3492-98.

Характеристика основных свойств вакцинного штамма туляремийного микроба 15 НИИЭГ

№№ п/п	Признак	Наличие признака
1	Морфология – мелкие кокки	+
2	Подвижность	–
3	Окраска по Граму – грамнегативные	+
4	Рост на питательной среде с 5—10 % крови белых в SR-форме колоний (% к числу выросших)	Не менее 80
5	Агглютинабельность сывороткой диагностической туляремийной	До титра
6	Ферментация глюкозы с образованием кислоты без газа	+
7	Ферментация мальтозы с образованием кислоты без газа	+
8	Ферментация маннозы с образованием кислоты без газа	+
9	Ферментация левулезы с образованием кислоты без газа	+
10	Ферментация глицерина	–
11	Образование сероводорода	+
12	Выделение индола	–
13	Чувствительность к эритромицину	–

Приложение 2
(обязательное)

Определение остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на белых мышах

Определение остаточной вирулентности проводят параллельно для испытуемого и контрольного вакцинных штаммов. Для этого 140 белых мышей массой 18—20 г делят на 2 группы методом случайной выборки по 70 животных, 1 группа – для испытуемого штамма, 2 – для контрольного.

Используют двухсуточную агаровую культуру каждого штамма 2 пассажа, выращенную на питательной среде Мак-Коя или на FT-агаре. Готовят взвесь культуры концентрацией 1 х 10^9 м.к./мл. Затем последовательно десятикратно разводят в 0,9 % растворе натрия хлорида с 10^{-1} до 10^{-8}, что соответствует от 1 х 10^8 до 10 м.к./мл и вводят животным подкожно в заднюю правую лапку по 0,5 мл приготовленных взвесей, что соответствует 5×10^6, 5×10^5, 5×10^4, 5×10^3, 5×10^2, 50 и 5 м.к. Каждую дозу каждого штамма вводят 10 животным. Для подсчёта LD_{50} и расчёта вводимых доз производят высев культуры из разведения 10^{-6} по 0,1 мл на 5 чашек, содержащих FT-агар. Гибель мышей учитывают в сроки до 21 сут. после введения культуры. Животных, павших на 5—10 сут., вскрывают, обращают внимание на патоморфологические изменения, производят посев селезенки методом отпечатка на питательную среду Мак-Коя или FT-агар (посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 10 сут., ежедневно просматривая). Если в посевах обнаруживается рост культуры, ее идентифицируют в РИФ (реакции прямой иммунофлуоресценции) с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремийными (ФСП 42-0180-5315—04). Гибель мышей от испытуемого 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.

Вакцинный штамм туляремийного микроба должен обладать остаточной вирулентностью для белых мышей, LD_{50} его должна быть в пределах от 10^2 до 2×10^6 м.к.

Величину LD_{50} вычисляют по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg D - 1(\Sigma L_i - 0{,}5), \text{ где}$$

D – максимальная из испытанных доз;

L_i – отношение числа животных, погибших при введении данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

ΣL_i – сумма значений L_i, вычисленных для всех испытанных доз.

Если величина LD_{50} для контрольного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ окажется выше или ниже лимита, контроль повторяют по той же методике; если величина LD_{50} для испытуемого штамма не удовлетворяет требованиям лимита, а контрольного штамма – удовлетворяет, испытуемый штамм не соответствует требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам по степени остаточной вирулентности.

Приложение 3
(обязательное)

Определение остаточной вирулентности и безвредности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках

Оценку безвредности вакцинного штамма туляремийного микроба проводят на здоровом поголовье морских свинок массой 400—500 г.

3.1. Перед началом опыта состояние здоровья животных оценивают совместно ветеринарный врач и член комиссии по изучению нового вакцинного штамма туляремийного микроба.

Поступивших животных выдерживают под наблюдением в течение 10 сут. обсервации. Оценку здоровья поголовья морских свинок начинают проводить с клинического осмотра, взвешивания, измерения ректальной температуры (не должна превышать 38 °С). Повторное обследование животных (взвешивание, термометрирование, клинический осмотр) проводят накануне эксперимента (за сутки). Перед подкожным введением культур изучаемого и контрольного штаммов туляремийного микроба животных с учетом показателей массы тела распределяют на равнозначные группы для каждого штамма и каждой группы. На каждый штамм берут по 150 морских свинок – 4 равнозначных групп по 30 животных в каждой, и 30 – для контроля. В оценку состояния здоровья морских свинок входят данные патологоанатомического и гистологического исследований. Для этого из каждой группы по 10 животных вскрывают и исследуют в 3 этапа: в начале обсервации, в день начала опыта и через 30 сут. после постановки опыта.

3.2. Распространяемость, приживаемость, безвредность и реактогенность культуры испытуемого вакцинного штамма F. tularensis, а также вызываемые им морфологические изменения в органах и тканях животных (морские свинки).

Данные характеристики исследуемого штамма определяют в одном опыте на одной и той же группе животных в сравнении с контрольным штаммом.

В опыте используют двухсуточные агаровые культуры 2 пассажа с питательной среды Мак-Коя или FT-агара испытуемого и контрольного штаммов. Каждую дозу 5×10^3, 5×10^5, 5×10^7 и 5×10^9 м.к. (дозы определяют по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28—85П соответствующего года выпуска) вводят подкожно в правую паховую область 30 морским свинкам в объеме 1 мл. Для подсчёта LD_{50} и расчёта вводимых доз производят высев культуры из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 5 чашек, содержащих FT-агар.

3.3. Для определения распространяемости, приживаемости микробов в органах и тканях, характера патоморфологических изменений, возникающих после введения культур, животных по 3 на каждую дозу поочередно умерщвляют хлороформом на 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 сутки, оставшихся в живых животных умерщвляют на 45-е сут. после введения испытуемых культур. Сразу после умерщвления животных проводят их вскрытие и описание видимых патологоанатомических изменений и бактериологическое исследование внутренних органов, а также забирают органы для патогистологического исследования.

3.4. Вскрытие животных производят общепринятым методом. Для каждого животного берут отдельную банку емкостью 300—500 мл с притертой или резиновой пробкой, на $^2/_3$ заполненную 10 %-м раствором нейтрального формалина. В банку помещают бумажную этикетку, на которой графитовым карандашом четко и крупно написаны с обеих сторон: номер животного, шифр испытуемой культуры, дата взятия материала и день наблюдения. На бумажных этикетках пишут названия органов, которые после вскрытия помещают на них. Затем в банку для каждого животного помещают лимфатические узлы, кусочки органов и тканей вскрытого животного. Результаты патологоанатомического исследования записывают в протокол вскрытия (см. в конце приложения).

При вскрытии морских свинок отмечают состояние кожи, подкожной клетчатки, подлежащих мышц в месте введения микробной культуры, характер и распространенность отмечаемых в них изменений. Особое внимание обращают на степень инъекции сосудов подкожной клетчатки, величину отека, на развитие геморрагических, гнойных и некротических изменений. Указывают размеры (в мм) регионарных к месту введения культуры паховых лимфатических узлов, их цвет, плотность, спаянность с окружающими тканями и состояние отдаленных (контрлатеральных) подмышечных узлов. После высева методом отпечатков на плотную питательную среду кусочки ткани с места введения погружают в раствор формалина, а лимфатические узлы помещают на отдельную этикетку (см. выше) и опускают в фиксатор. Затем вскрывают брюшную и грудную полости. Отмечают полнокровие внутренних органов, состояние плевральных полостей, сальника, висцеральной брюшины, кишечника. Из всех внутренних органов (печень, селезенка, легкие, сердце) методом отпечатков производят посевы на поверхность питательного агара. При описании внутренних органов обращают внимание на наличие в легких мелких серовато-розовых очажков или тяжей, расположенных по ходу сосудов и бронхов, в печени и селезенке узелков и очагов некроза, отмечая их количество, размеры и внешний вид. Увеличе-

ние селезенки лучше регистрировать указанием ее размеров (длины, ширины, толщины). Кусочки органов берут обязательно на границе с измененными участками (если они обнаружены) и помещают в банку с фиксатором. После исследования легких, сердца, селезенки, печени и взятия из них кусочков размером 1 × 1 × 1 см, тонкий кишечник отодвигают в правую сторону (по отношению к свинке), пинцетом берут почку, надрезая ее, кроме этого для исследования берут надпочечник и подвздошные лимфатические узлы. Отмечают размеры, консистенцию, цвет, а также состояние окружающей клетчатки. Наконец, выделяют мезентериальные лимфатические узлы, расположенные ближе к корню брыжейки и характеризуют их по схеме, приведенной выше. В последнюю очередь берут костный мозг вместе с кусочком диафиза бедренной кости. При этом кость надо расщепить, т.к. она может препятствовать проникновению фиксатора. Собранный материал помещают в формалин на 14 сут. при температуре 18—25 °С. После чего проводят его контроль на специфическую стерильность, затем подвергают дальнейшему гистологическому исследованию.

3.5. Во время вскрытия проводят высевы из органов, тканей и лимфатических узлов на агаровые пластины в чашках Петри с питательными средами FT-агаром, с агаром с 1 %-й кровью и агаром Эндо. На агар для выделения туляремийного микроба делают высев из места введения культуры, правого подвздошного лимфатического узла, костного мозга (первая чашка), из лимфатических узлов – правого пахового (регионарного) и левого пахового, правого и левого подмышечного (вторая чашка), из печени и селезенки (третья чашка), из легких и сердца (четвертая чашка). На агар с 1—2 %-й кровью делают высев из легких и крови, на агар Эндо – из печени и селезенки. Высевы из органов проводят методом множественных отпечатков, костный мозг берут и сеют бактериологической петлей из бедренной кости, посев крови производят мазком-отпечатком отсеченной верхушкой сердца. Все посевы помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 5—7 сут. Погибших в ходе опыта животных исследуют так же, как и умерщвленных. Кроме того, при вскрытии погибших морских свинок дополнительно делают посевы на агар Эндо из тонкого, толстого кишечника и мезентериальных лимфатических узлов. Все посевы просматривают ежедневно начиная со 2 до 7 сут. инкубирования.

В зависимости от результатов бактериологического исследования могут быть приняты следующие решения по дальнейшему ведению испытаний:

1) Культура туляремийного микроба выделена из всех внутренних органов. Штамм не может быть признан безвредным. Дальнейшие испытания вакцинного штамма следует прекратить.

2) Выделяемая из органов подопытных животных культура испытуемого штамма туляремийного микроба контаминирована посторонней микрофлорой. В этом случае вопрос может быть решен следующим образом:

а) если контаминированная посторонней микрофлорой культура испытуемого вакцинного штамма выделена из органов только нескольких (от 1—2 морских свинок из всей группы), то этих животных не учитывают при анализе результатов испытаний и опыт продолжают;

б) если контаминированная посторонней микрофлорой культура испытуемого вакцинного штамма выделена от большого числа опытных морских свинок, то следует считать, что опыт поставлен на неполноценных животных, и его необходимо повторить с использованием здоровых морских свинок.

3) Культуру испытуемого штамма из органов подопытных животных выделить не удалось, но на агаровых средах выявлен рост посторонней микрофлоры. Если такой результат получен в высевах из нескольких подопытных животных (1—2 морских свинок), то этих животных не учитывают. В том случае, когда посторонняя микрофлора выделена от большого числа животных, опыт повторяют на новой партии здоровых животных.

4) Если штамм удовлетворяет перечисленным требованиям, то он признается вакцинным.

3.6. Методика определения реактогенности вакцинного штамма для морских свинок. Реактогенность испытуемого и контрольного штаммов для морских свинок определяют по характеру прижизненных изменений в месте введения 5×10^3, 5×10^5, 5×10^7 и 5×10^9 м.к. и в регионарном лимфатическом узле, по изменению температуры и массы тела свинок. Наблюдения проводят за животными из опыта по изучению безвредности, которые согласно плану должны умерщвляться на 30-е сут. после введения культур. Животных осматривают через 1—2; 3—4; 7—8 и 10—11 сут. после введения им испытуемого штамма. Реакцию на месте введения определяют путем пальпации и измерения участков уплотнения, инфильтратов, путем определения размеров лимфатических узлов, их подвижности, болезненности.

Измерение температуры тела проводят ректально или орально с помощью медицинского термометра или другого, подобного ему по технической характеристике.

Массу тела животного определяют с точностью до одного грамма.

3.7. Морфологические изменения у морских свинок изучают макроскопически и гистологически в динамике после однократного подкожного введения в правую паховую область культуры испытуемого

штамма в малой (5×10^3 м.к.), средних (5×10^5 и 5×10^7 м.к.) и максимальной (5×10^9 м.к.) дозах двухсуточной агаровой культуры.

Протокол вскрытия

от_____ г.

№ животного _____вид _____ пол _____ масса_____
температура тела _____доза _____ Название культуры _____
срок наблюдения _____ Метод и место введения _____
Дата введения _____гибели _____ умерщвления _____
Результаты вскрытия
Упитанность _____
Состояние подкожных сосудов _____
Место введения _____
Лимфатические узлы:
Правый паховый _____
Левый паховый _____
Правый подмыш. _____
Левый подмыш. _____
Подвздошные _____
Паратрахеальные _____
Бифуркационные _____
Легкие _____
Селезенка _____
Печень _____
Почки _____
Надпочечники _____
Другие органы _____
_____
Костный мозг _____

Подпись Дата

Статистический анализ всех полученных результатов осуществляют с определением средних величин показателей и их доверительных интервалов для уровня вероятности 95 % (И. П. Ашмарин и А. А. Воробьев, 1962).

Приложение 4
(обязательное)

Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках

Стабильность биологических свойств культуры испытуемого вакцинного штамма туляремийного микроба определяют после 10-кратных пассажей ее на морских свинках массой 400—450 г при подкожном способе введения.

Для первого пассажа используют двухсуточную агаровую культуру испытуемого штамма второй генерации, выращенную на среде Мак-Коя или на FT-агаре. Готовят взвесь культуры концентрацией 1 х 10^9 м.к. / мл (как описано в прилож. 1) и шприцем объемом 5 мл вводят по 1 мл в правую паховую область 2 морским свинкам. Через 4 сут. животных умерщвляют хлороформом и вскрывают. Для последующего пассажа у умерщвленных животных забирают регионарные (паховые) лимфатические узлы и селезенку (400—500 мг), помещают их в фарфоровую ступку с 1—2 г стерильного мелкого речного песка и растирают пестиком до гомогенного состояния.

Затем в ступку вносят 5 мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия и суспендируют гомогенат; дают осесть крупным кусочкам тканей и песку на дно ступки, надосадочную жидкость забирают шприцем и вводят подкожно в правую паховую область по 0,5 мл 2 морским свинкам (второй пассаж). Параллельно делают посев суспензии на скошенную питательную среду в пробирках Мак-Коя или FT-агар для подтверждения наличия культуры испытуемого штамма *F. tularensis*. Посевы помещают в термостат и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 сут. Аналогично второму пассажу проводят пассажи с третьего по десятый, каждый раз на двух свинках и с параллельным высевом на питательную среду. Если в каком-либо из пассажей культура не выделяется, в дальнейшем используют культуру, полученную на питательной среде от предыдущего пассажа.

Субкультуру, выделенную после десятого пассажа, а также все субкультуры, выделенные от погибших животных и умерщвленных с явлениями генерализации, параллельно с культурой контрольного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ изучают: по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам, безвредности (по методике, описанной в прилож. 1).

Безвредность определяют по укороченной схеме для морских свинок (дозы – 5 х 10^5 и 5 х 10^9 м.к.) и по полной схеме для белых мышей; вскрытие и исследование животных проводят на 7, 14 и 21-е сут. после введения. Методика исследования в соответствии с прилож. 3. Культура испытуемого вакцинного штамма *F. tularensis* после 10 пассажа должна быть стабильной и типичной по вышеперечисленным признакам в соответствии с прилож. 1 и 2.

Приложение 5
(обязательное)

Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему морских свинок

Методика подготовки испытуемого штамма для данных определений аналогична описанной в прилож. 1.

Влияние испытуемого штамма на иммунную систему определяют на морских свинках массой 300—400 г. Экспериментальных животных иммунизируют однократно подкожно согласно прилож. 3 дозами 5 x 10^3 м.к. и 5 x 10^4 м.к. односуточной агаровой культурой испытуемого и контрольного вакцинных штаммов туляремийного микроба 15 НИИЭГ. Для проведения исследований по нижеперечисленным тестам каждую дозу испытуемого и контрольного штаммов вводят 10 животным.

Одновременно 10 морским свинкам вводят плацебо – 0,9 %-й раствор натрия хлорида.

Группы животных формируются методом случайной выборки равнозначных по полу и массе. Иммунологические исследования проводят через 1, 3, 7, 14 и 28 сут. после введения испытуемого штамма. При обнаружении изменений в показателях необходимо срок наблюдения продлить до восстановления изучаемых показателей до исходного уровня и (или) уровня в контрольных группах.

Проводят следующие виды исследований в соответствии с РД 42-28-10-90 и «Медицинскими лабораторными технологиями» (Справочник, 2002). Животных для данных опытов используют тех же, что и для определения безвредности, реактогенности и приживаемости штамма (прилож. 3).

5.1. Определение количества лейкоцитов в крови

Готовят 3 %-й раствор уксусной кислоты, подкрашенный для окраски ядер лейкоцитов несколькими каплями раствора метиленового синего. Раствор имеет голубой цвет, длительно хранится. В пробирку с 1,9 мл раствора уксусной кислоты вносят 0,1 мл крови (можно использовать стабилизированную антикоагулянтами венозную кровь) и перемешивают. Каплю содержимого пробирки помещают в счетную камеру Горяева. Заполненную камеру оставляют в горизонтальном положении на 1 мин для оседания лейкоцитов. Затем помещают её на столик микроскопа и при малом увеличении (окуляр 10x, объектив 8x) подсчитывают лейкоциты в 100 больших квадратах. Расчет лейкоцитов проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100} = a \cdot 50 \text{, где}$$

X – число лейкоцитов в 1 мкл крови;
a – число лейкоцитов в 100 больших квадратах;
20 – разведение крови;
100 – число больших квадратов;
250 – коэффициент пересчета на 1 мкл, т.к. объем одного большого квадрата равен 1/250 мкл (сторона квадрата –1/5 мм, высота – 1/10 мм).

Практически для расчета количества лейкоцитов в 1 мкл крови их число в 100 больших квадратах умножают на 50, а в 1 л – полученную величину умножают еще на 10^6.

5.2. Определение лейкоцитарной формулы

Лейкоцитарной формулой называется процентное соотношение различных видов лейкоцитов, определяемое при подсчете их в мазке крови.

Для приготовления мазка на чистое, сухое, обезжиренное предметное стекло ближе к короткой стороне наносят стеклянной палочкой (или непосредственно из места прокола) небольшую каплю крови, оставляя стекло в горизонтальном положении каплей вверх. Влево от капли прикладывают плотно ребром шлифованное стекло под углом 45° и соединяют его с каплей. Ждут несколько секунд, пока капля не расплывется полностью вдоль ребра шлифованного стекла. После этого быстрым, равномерным движением, не сильно надавливая, проводят по стеклу полосу в сторону, противоположную от капли. Мазки высушивают на воздухе. Высохший мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, занимать почти всю длину стекла и заканчиваться неровными зигзагами в виде «метелочки». Фиксацию проводят в этиловом (10 мин) или метиловом (4 мин) спирте, окрашивают по Романовскому-Гимзе. В качестве красителя используют готовый раствор Романовского-Гимзы, который перед употреблением разводят из расчета 1 капля краски на 1 мл нейтральной (pH 7,0) дистиллированной воды. Время окраски устанавливают опытным путем для каждой партии красителя (25—40 мин).

Мазки просматривают в световом микроскопе (иммерсионная система, объектив 90х, окуляр 7х или 10х). На каждом стекле суммарно просчитывают не менее 200 клеток, учитывая отдельные виды лейкоцитов. Исходя из полученных результатов, вычисляют процентное содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и других клеток белой крови. Чтобы определить содержание отдельных видов лейкоцитов в 1 мкл крови в абсолютных числах, необходимо сначала подсчитать общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови и, отбросив две последние цифры,

умножить на процент содержания отдельного вида. Например: количество лейкоцитов в 1 мкл крови равно 5 000, процент лимфоцитов равен 30. Следовательно, абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл крови будет 50 x 30 = 1 500.

5.3. Выделение лимфоцитов из крови морских свинок

Кровь у морских свинок берут из сердца в объеме 2 мл в пробирку со средой 199 или раствором Хенкса с (25 ± 0,5) ед/мл гепарина в соотношении 1 часть крови и 3 части среды. После перемешивания разведенную кровь наслаивают в пробирке на водный раствор верографина плотностью (1,077 ± 0,002) г/мл, не допуская смешивания слоев. Соотношение объемов 2 : 1. Затем центрифугируют (15 ± 1) мин при (450 ± 25) g. Пастеровской пипеткой с тонко оттянутым капилляром собирают образовавшееся над слоем верографина беловатое кольцо лимфоцитов. Полученная взвесь содержит примесь градиента плотности и тромбоцитов, которые удаляют путем 2-кратного отмывания клеток в охлажденном растворе Хенкса без ионов магния и кальция. Режим центрифугирования – (10 ± 1) мин при (280 ± 20) g. По завершении процесса отмывания клеток осадок ресуспендируют в среде 199 или среде Игла. Необходимая для дальнейших исследований концентрация клеток должна составлять 2 x 10^6 клеток в 1 мл.

5.4. Определение количества лимфоцитов во взвеси

Из полученного 1 мл клеточной взвеси после ресуспендирования отбирают 0,02 мл и переносят в пробирку с 0,38 мл 3 %-го раствора уксусной кислоты, подсиненной раствором метиленового синего, затем перемешивают. Каплю содержимого пробирки помещают в счетную камеру Горяева. Клетки считают под микроскопом при малом увеличении (окуляр 10x, объектив 8x) в 100 больших квадратах и умножают полученное число на 5,0 x 10^4 (коэффициент пересчета количества клеток, подсчитанных в камере Горяева, в количество клеток, содержащихся в 1 мл взвеси). Необходимая для дальнейших исследований рабочая концентрация клеток должна составлять 2,0x10^6 клеток в 1 мл.

5.5. Определение жизнеспособности лимфоцитов

К 0,1 мл взвеси лимфоцитов в рабочей концентрации добавляют 1 каплю 0,2 %-го раствора трипанового синего (или 0,1 мл 0,2 %-го эозина БА в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, pH 7,2). Суспензию оставляют на 30 с при температуре (20 ± 2) °С, а затем под микроскопом в камере Горяева учитывают результат. Живые лимфоциты остаются бесцветными, а погибшие клетки окрашиваются. При правильном выделении лимфоцитов живых клеток должно быть не менее 98 %.

5.6. Определение количества Т-лимфоцитов цитотоксическим тестом

Цитотоксический тест – это иммунологическая реакция, позволяющая выявить антигены, расположенные на поверхности жизнеспособных лимфоцитов. Основной принцип метода заключается в том, что антитела, направленные против различных лимфоцитарных антигенов, фиксируются специфически на клетках, содержащих эти антигены, и в присутствии комплемента нарушают целостность клеточной мембраны. Образование «отверстия» в мембране лимфоцитов позволяет прибавленному к взвеси красителю (трипановый синий) проникать внутрь клетки и окрашивать её. Жизнеспособные с интактной мембраной клетки этим красителем не окрашиваются.

Коммерческую поликлональную сыворотку против Т-лимфоцитов разводят средой 199 до рабочей концентрации, указанной на этикетке. В центрифужной пробирке или в лунке панели смешать 60 мкл сыворотки, 20 мкл исследуемой взвеси лимфоцитов (концентрация 10^7 кл/мл) и 20 мкл комплемента морской свинки в разведении 1 : 3. В контрольные пробирки или лунки вносят 20 мкл взвеси лимфоцитов (концентрация 10^7 кл/мл), 20 мкл взвеси комплемента и 60 мкл среды 199. Смеси перемешивают и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 2) °С в течение 25—30 мин. В каждую пробирку или лунку добавляют по 1 200 мкл 0,5 % раствора трипанового синего (500 мг красителя растворяют в 100 мл горячего 80—90 °С 0,9 %-го раствора хлорида натрия; перемешивают 10 мин на магнитной мешалке и фильтруют через фильтровальную бумагу). Через 30—60 с взвесь из лунки помещают в счетную камеру. Определяют число погибших клеток, вычисляют их процент от общего количества клеток в препарате, подсчитывают цитотоксический индекс (ЦТИ) по формуле:

$$ЦТИ = 100 \cdot \frac{\%\,убитых\ клеток\ в\ опыте - \%\ убитых\ клеток\ в\ контроле}{100 - \%\ убитых\ клеток\ в\ контроле}$$

ЦТИ указывает, какой процент клеток среди исследуемой взвеси несет соответствующий антигенный маркер и, следовательно, принадлежит к данной популяции.

5.7. Определение количества В-лимфоцитов цитотоксическим тестом.

Общее количество В-лимфоцитов определяют в цитотоксическом тесте с коммерческой поликлональной специфической сывороткой против В-лимфоцитов. Постановка теста аналогична постановке цитотоксического теста с анти-Т-сывороткой.

5.8. Определение количества В-лимфоцитов иммунофлюоресцентным методом

Принцип метода основан на том, что В-лимфоциты несут поверхностные иммуноглобулины, которые выявляются в реакции иммунофлюоресценции с помощью антииммуноглобулиновых антител, меченных флюорохромом.

В пробирки, помещенные на ледяную баню, вносят 0,1—0,25 мл суспензии лимфоцитов (5 х 10^6 лимф./мл) в растворе Хенкса с 1—5 % раствором бычьего сывороточного альбумина. Затем добавляют равный объем иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих антивидовых против иммуноглобулинов морской свинки в рабочем разведении (раствор антител готовят в забуференном 0,9 % растворе натрия хлорида). Смесь инкубируют и помешивают в течение 30 мин при (4 ±0,5) °С в присутствии 0,25 % раствора азида натрия, после чего суспензию клеток 3 раза отмывают, добавляя к осадку раствор Хенкса и центрифугируя (10 ± 1) мин при (450 ± 20) g. Последнее (третье) отмывание проводят охлажденным до 4 °С забуференным 0,9 % раствором натрия хлорида, так как раствор Хенкса и среда 199 обладают оптической активностью и могут искажать результаты микроскопии. Осадок ресуспендируют в 0,05 мл забуференного 0,9 % раствора натрия хлорида и наносят на тщательно вымытое и обезжиренное предметное стекло (из нефлуоресцирующего стекла), с проведенными парафиновым стеклографом окружностями, ограничивающими исследуемый материал. Накрывают покровным стеклом, окантовывают вазелином и микроскопируют с помощью люминесцентного микроскопа, используя светофильтры, рекомендованные инструкцией для ФИТЦ, и масляную иммерсионную систему. При микроскопии учитывают клетки, имеющие кольцевое или точечное (гранулярное) свечение. Диффузно окрашенные клетки не учитываются. Параллельно с помощью фазово-контрастного устройства проводят подсчет количества клеток в каждом поле зрения. Относительное процентное содержание В-лимфоцитов определяют после подсчета 200 –300 клеток в препарате по формуле:

$$X = B \times 100/A, \text{ где:}$$

А – общее количество клеток;

В – количество клеток со специфическим свечением.

Для подсчета абсолютного содержания В-лимфоцитов используют следующую формулу:

$$Д = А \times Б \times В/10\,000, \text{ где:}$$

Д – абсолютное содержание В-лимфоцитов в 1 л крови;

А – количество лейкоцитов в 1 л крови;
Б – процентное содержание лимфоцитов в пуле лейкоцитов крови;
В – процент В-лимфоцитов в пуле лимфоцитов крови.

Результаты исследований отражают в таблице:

Сутки исследования	Абсолютное содержание		Относительное содержание (%)	
	В-лимфоциты	р с К	В-лимфоциты	р с К
Контроль (К)				
1				
3				
7				
14				
28				

5.9. Определение фагоцитарной активности макрофагов

Фагоцитарная активность (ФА) определяется процентом фагоцитирующих клеток и количеством захваченных частиц на один фагоцит (фагоцитарное число – ФЧ).

Клетки перитонеального экссудата (КПЭ) выделяют асептически от морских свинок опытной и контрольной групп. Делают разрез по срединной линии передней брюшной стенки и осторожно отсепаровывают кожный лоскут, не нарушая целостности брюшины. Через прокол иглой, соединенной со шприцом, в брюшную полость вводят 20 мл среды 199, содержащую 5 МЕ гепарина в 1 мл. Осторожно массируют переднюю брюшную стенку. Через 3—5 мин через надрез в брюшине пастеровской пипеткой, соединенной с резиновой грушей, собирают содержимое и сливают через нейлоновый фильтр в пробирки, стоящие на льду. Не используют экссудаты, содержащие примесь эритроцитов. Затем клетки осаждают центрифугированием (280 ± 20) g при температуре (4 ± 0,5) °С в течение (10 ± 1) мин, ресуспендируют в среде 199 с 10 % сывороткой крупного рогатого скота и антибиотиками (100 ед/мл) до конечной концентрации 2×10^6 кл/мл. Полученную суспензию клеток разливают по 2 мл в чашки Петри диаметром 40 мм, которые инкубируют при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере с 5 % CO_2. Через 60 мин смывают не прилипшие клетки раствором Хенкса, добавляют 2 мл свежей среды 199 и инкубируют в течение следующих 18 ч при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере с 5 % CO_2.

Клетки для исследования фагоцитоза можно получить также на половинках покровных стекол, помещенных в пробирки с 1,5—2 мл КПЭ.

Объектом фагоцитоза могут служить эритроциты барана, дрожжеподобные грибы *Candida albicans* или лабораторный штамм *Staphilococcus* (9198) или любые другие микробные клетки. Суточные культуры живых или убитых прогреванием при температуре 90 °С микроорганизмов отмывают не менее 3 раз 0,9 %-м раствором натрия хлорида, ресуспендируют в нем и определяют концентрацию суспензии по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц. Взвесь разводят средой 199 до концентрации, соответствующей соотношению 1,0—2,0 x 10^9 м.к./мл.

Эритроциты барана (ЭБ) трижды отмывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,2, осаждая центрифугированием при (400 ± 20) g в течение 5 мин. Готовят 0,5 %-ю взвесь ЭБ на среде 199.

В чашки Петри, содержащие КПЭ, наливают 1 мл свежей среды 199 и вносят по 1 мл 0,5 %-й взвеси ЭБ или соответствующих микроорганизмов и инкубируют при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере с 5 % CO_2. Через 30—60 мин чашки споласкивают холодным раствором Хенкса, высушивают при комнатной температуре, фиксируют в метаноле (или в смеси Никифорова) или парами 10 %-го раствора формалина (5—10 мин), окрашивают по Романовскому-Гимзе.

При микроскопии препаратов учитывают не менее 200 клеток, подсчитывая фагоцитирующие клетки и количество содержащихся в них ЭБ или микробов.

Результаты выражают процентом фагоцитирующих клеток (ФА) и фагоцитарным числом (ФЧ), которое определяется средним числом поглощенных ЭБ или микробов на один фагоцит.

Процент фагоцитирующих клеток (ФА) рассчитывается по формуле:

$$ФА = B \times 100/A, \text{ где:}$$

A – общее количество клеток;

B – количество фагоцитирующих клеток с поглощенными ЭБ или микробами.

Результаты исследований представляют для каждой дозы в таблице:

Сутки исследования	ФА	p с контролем	ФЧ	p с контролем
Контроль				
1				
3				
7				
14				
28				

5.10. Получение взвеси клеток селезенки

Животных умерщвляют и извлекают селезенку. Селезенку освобождают от прилежащих тканей, капсулы, измельчают в охлажденном растворе Хенкса без ионов кальция и магния и продавливают через стальное сито с диаметром пор 1 мм (или селезенку взвешивают на торсионных весах и осторожным раздавливанием в стеклянном гомогенезаторе готовят взвесь клеток из расчета 1 мл среды 199 на 50 мг ткани селезенки). Полученную суспензию фильтруют через нейлоновый фильтр. Содержание ядросодержащих клеток селезенки определяют с использованием раствора трипанового синего. На основании полученной цифры и веса селезенки можно рассчитать абсолютное количество ядросодержащих клеток в селезенке. 0,5 мл взвеси спленоцитов отмывают 5 мл среды 199 путем центрифугирования в течение 10 мин при 150 g, надосадок удаляют, осадок разводят средой 199 с 10 %-ми сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиками (100 ед/мл) до исходной концентрации.

5.11. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) спонтанная и под влиянием Т- и В-клеточных митогенов

Для спонтанной РБТЛ суспензию спленоцитов ($5x10^6$ кл/мл) на «среде культивирования» (среда RPMI-1640, содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глютамина, $5x10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанола, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) разливают в 96-луночную пластиковую панель по 200 мкл в лунку (по три лунки на каждый образец) и инкубируют в CO_2-инкубаторе (5 % CO_2) при температуре 37 °С в течение 72 ч. Затем добавляют ^{3}Н-тимидин в объеме 25—50 мкл в среде RPMI-1640 на лунку и инкубируют в тех же условиях еще 16—24 ч. По окончании инкубации клетки переносят на фильтры с помощью прибора «Cell Harwestr», фильтры после сушки в термостате при температуре 37 °С помещают во флаконы, содержащие по 3 мл стинтилляционной жидкости (на 1 л толуола 0,2 г POPOP и 5 г PPO).

Реакция бласттрансформации лимфоцитов под влиянием Т- и В-клеточных митогенов служит для оценки функциональной активности лимфоцитов. Специфическое распознавание митогена индуцирует в клетках пролиферацию, т. е. деление клеток. Некоторые митогены селективно стимулируют различные субпопуляции лимфоцитов. Например, КонА стимулирует тимоциты, зрелые и незрелые Т-клетки, ФГА стимулирует пролиферацию только зрелых Т-клеток. Такие митогены, как липополисахарид и бактериальный липопротеин стимулируют пролиферацию В-клеток. Благодаря этой селективности митогены могут

использоваться для характеристики функционального состояния различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

Постановку РБТЛ под влиянием митогенов осуществляют так же, как спонтанную, только в опытные лунки добавляют Т- или В-клеточные митогены (не менее 3 лунок на каждый митоген) в оптимальной стимулирующей дозе (КонА 1—15 мкг/мл, ФГА 10—15 мкг/мл, ЛПС 15—100 мкг/мл). Контролем служат лунки с взвесью лимфоцитов без добавления митогенов.

Учет результатов.

Радиоактивность (имп/мин) образцов измерить с помощью β - счетчика. Учет реакции можно проводить визуально, определяя процент бластных форм лимфоцитов. Результаты представляют в виде индексов стимуляции клеток (ИСК), которые подсчитывают по формуле:

$$ИСК = \frac{имп/мин\ в\ культуре\ с\ митогеном}{имп/мин\ в\ культуре\ без\ митогена}$$

Результаты определений отражают в таблице:

Сутки	№ животного	Стимуляция Т-системы				Стимуляция В-системы	
		ФГА	р с К	Con A	р с К	ЛПС	р с К
7							
14							
28							
Контроль (К)							

5.12. Определение поликлональной активности В-лимфоцитов

Для получения этого показателя определяют число клеток, продуцирующих антитела к эритроцитам барана (АОК). Необходимо подчеркнуть, что иммунизация морских свинок эритроцитами барана в этих опытах не проводится, а определяют количество спонтанных «фоновых» АОК в селезенке. Увеличение их количества после введения вакцины является показателем поликлональной активации В-лимфоцитов. Число АОК в селезенке определяют методом локального гемолиза в геле.

Выявление антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле производят следующим образом.

Эритроциты барана (ЭБ) трижды отмывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,2, осаждая центрифугированием при (400 ± 20) g в

течение 7 мин, добавляют к 0,9 %-му раствору агарозы*) из расчета 2—3 x 10^7 эритроцитов в 1 мл. Полученную рабочую смесь разливают по 2,5 мл в пробирки, помещенные в водяную баню при температуре 43—44 °С. В каждую пробирку добавляют по 0,2 мл взвеси исследуемых клеток селезенки (концентрация 10^7 кл/мл), перемешивают и выливают на чашку Петри, равномерно распределяя по дну. Через 5 мин чашки помещают в термостат при температуре (37 ± 0,5) °С на 1 ч. Затем в каждую чашку вносят путем наслаивания по 2,5 мл разведенного в 5 раз средой 199 комплемента морской свинки, сухого или разведенного в 10 раз свежезамороженного комплемента. После 30 мин инкубации при температуре (37 ± 0,5) °С, подсчитывают число зон гемолиза на каждой чашке. Рассчитывают число АОК на 1 x 10^6 ядросодержащих клеток селезенки. Рассчитывают индекс поликлональной стимуляции (ИПС) по формуле:

$$ИПС = \frac{\textit{число АОК на } 1 \cdot 10^6 \textit{ ядросодержащих клеток в опыте}}{\textit{число АОК на } 10^6 \textit{ ядросодержащих клеток в контроле}}$$

Результаты исследований для морских свинок, иммунизированных дозами 5 x 10^3 и 5 x 10^4 м.к., отражают в таблице:

Сутки	Число АОК на 10^6	Р с К	Индекс поликлональной стимуляции
Контроль (К)			
3			
7			
14			
28			

---

* *Приготовление 0,9 %-го раствора агарозы*: навеску сухой агарозы (см. табл.) смешивают с дистиллированной водой, смесь кипятят на водяной бане до полного растворения агарозы; емкость с раствором переносят в водяную баню с температурой 43—44 °С, добавляют 10-кратный раствор Хенкса, pH раствора доводят до 7,2 1 %-м раствором KH_2PO_4 или NaOH (по цвету индикатора, присутствующего в растворе Хенкса и имеющего при значениях pH 6,8—7,0 – желтовато-оранжевый цвет, 7,2—7,4 розовато – красного цвета, при значениях pH выше 7,4 – малиновый цвет).

Количество чашек	Масса агарозы	Объем дистиллированной воды	Объем концентрата раствора Хенкса (10-кратный)
10	225 мг	22,5 мл	2,5 мл

5.13. Исследование иммунореактивности на гетерологичный антиген

Исследуют влияние испытуемого штамма на развитие иммунного ответа морских свинок на гетерологичный антиген (эритроциты барана) по формированию АОК к эритроцитам барана (ЭБ).

Для проведения этих экспериментов морских свинок разделяют на 2 группы по 8 штук в каждой. Морских свинок первой группы иммунизируют изучаемым штаммом, морские свинки второй группы – интактные (контрольные). Морским свинкам обеих групп вводят внутривенно по 1 мл 50 % взвеси отмытых эритроцитов барана. Иммунный ответ на гетерологичный антиген оценивают по количеству АОК (5.10) через 4 сут после введения эритроцитов. Рассчитывают индекс поликлональной стимуляции (ИПС) по формуле:

$$ИПС = \frac{\text{число АОК на } 10^6 \text{ ядросодержащих клеток селезенки в опыте}}{\text{число АОК на } 10^6 \text{ ядросодержащих клеток селезенки в контроле}}$$

Результаты исследований отражают в таблице:

Группа свинок	АОК к ЭБ	Индекс стимуляции	p с интактными
Иммунизированные			
Интактные			

Приложение 6
(обязательное)

Определение прививаемости испытуемого вакцинного штамма

Прививаемость вакцинных штаммов туляремийного микроба проверяют накожно на морских свинках массой 300—400 г со светлой кожей. Накануне прививки у 20 морских свинок на боку выщипывают шерсть в зоне светлой (белой) кожи.

Для определения прививаемости используют двухсуточную агаровую культуру испытуемого и контрольного вакцинных штаммов второй генерации, выращенную на питательной среде Мак-Коя или на FT- агаре. Готовят взвесь культуры концентрацией 5 х 10^9 м.к. / мл туляремийного микроба в 0,9 %-м растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц, затем делают последовательные десятикратные разведения этой взвеси от 10^{-1} до 10^{-3}. Культурой из двух последних разведений 10^{-2} (5 х 10^7 м.к./мл) и 10^{-3} (5 х 10^6 м.к./мл) прививают накожно по 5 морских свинок каждой дозой, каждого штамма. Перед прививкой кожу обрабатывают спиртом или эфиром. После испарения спирта или эфира на кожу наносят по 2 капли взвесей из разведений 10^{-2} и 10^{-3} на расстоянии 2—3 см одна от другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делают по 2 параллельные насечки длиной в 1 см. Взвесь, нанесенную на кожу, тщательно втирают в течение 1 мин плоской стороной пера. Насечки следует делать таким образом, чтобы они излишне не кровоточили; кровь должна выступать только мелкими росинками при втирании взвеси микробов. Поверхностное нанесение на кожу царапин, без появления росинок крови, снижает эффективность прививки. Наблюдение за животными в опытной и контрольной группах ведут в течение 10 сут.; отмечают кожные реакции на месте прививки культур вакцинных штаммов: диаметр гиперемии (в мм), отека, наличие или отсутствие инфильтрата.

У всех привитых контрольным и испытуемым штаммами туляремийного микроба на вторые-пятые сутки после прививки должен появиться инфильтрат и гиперемия вокруг насечек размером 0,5—1,5 см.

Приложение 7
(обязательное)

Определение иммуногенной активности испытуемого вакцинного штамма

7.1. Определение иммуногенности при подкожном способе иммунизации морских свинок

Перед испытанием штамма на иммуногенность распределяют 66 морских свинок массой 300—400 г методом случайной выборки на три группы: 1 группа – 30 животных - для иммунизации контрольным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 2 группа – 30 животных – для иммунизации испытуемым штаммом, 3 группа – 6 животных – контроль.

Для определения иммуногенности используют двухсуточные агаровые культуры испытуемого и контрольного вакцинных штаммов второй генерации, выращенные на питательной среде Мак-Коя или на FT – агаре. Готовят взвеси культур концентрацией 5 х 10^9 м.к. / мл в 0,9 % растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц соответствующего года выпуска. Затем делают последовательные десятикратные разведения этих взвесей до разведения 10^{-9} (5 м.к./мл). Морских свинок иммунизируют подкожно в область верхней трети правого бедра испытуемым и контрольным вакцинными штаммами по 6 животных на каждую дозу: 5 х 10^4 м.к., 5 х 10^3 м.к., 5 х 10^2 м.к., 5 х 10^1 м.к. и 5 м.к. Культуру вводят одним шприцем в объеме 1 мл, начиная с меньшей дозы. Для подсчёта ED_{50} или расчёта количества фактически введённых туляремийных бактерий производят высев из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 5 чашек с FT – агаром.

Тест – заражающий штамм *F. tularensis* 503/840 (голарктического подвида) должен обладать типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами. Должен быть высоковирулентным - 1 Dcl (Dosis certa letalis) для морских свинок при подкожном заражении не должна превышать 5 м.к./мл. Для заражения используют двухсуточную агаровую культуру заражающего тест – штамма 2 пассажа, выращенную на питательной среде Мак-Коя или на FT – агаре. Готовят взвесь культуры концентрацией 5 х 10^9 м.к. / мл в 0,9 % растворе натрия хлорида по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц, затем делают последовательные десятикратные разведения этой взвеси до разведения 10^{-9} (5 м.к./мл), что соответствует 1 Dcl. Для подсчёта

ED_{50} или расчёта количества фактически введённых туляремийных бактерий производят высев из разведения 10^{-7} по 0,1 мл на 5 чашек, содержащих питательную среду (кровяную, гемоглобиновую или FT-агар), по обычной методике.

Через 25—30 сут. после иммунизации морских свинок (30 иммунизированных контрольным штаммом и 30 испытуемым) заражают подкожно в область верхней трети левого бедра в дозе, соответствующей 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийного микроба. Вирулентную культуру животным вводят в объеме 1 мл. Одновременно заражают по 3 контрольных морских свинки дозами 1 Dcl и 1000 Dcl. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 30 сут. Все контрольные морские свинки должны погибнуть в срок до 16 сут. Погибших животных регистрируют и вскрывают общепринятым методом, а органы и ткани (селезенку, печень, лимфатический узел из места введения, кровь) подвергают бактериологическому исследованию, высевая их методом отпечатков на питательную среду Мак-Коя или FT-агар.

Учет результатов посевов производят через 3—7 суток. Морских свинок с типичными для туляремии изменениями и выделением культуры туляремийного микроба считают погибшими от туляремии. Животных, погибших от неспецифических причин, исключают из числа взятых в опыт. В случае выживания контрольных свинок опыт следует повторить с использованием более вирулентного заражающего штамма.

Величину $ЕД_{50}$ испытуемого и контрольного вакцинных штаммов вычисляют по методу Кербера, описанному И. П. Ашмариным и А. А. Воробьевым (1962):

$$LgED_{50} = lgD - 1(\Sigma L_1 - 0{,}5), \text{ где}$$

D – максимальная из испытанных доз,

Li – отношение числа животных, иммунизированных данной дозой и выживших после заражения, к общему числу животных, которых иммунизировали этой дозой,

ΣLi – сумма значений Li, найденных для всех испытанных доз.

ED_{50} вакцинного штамма для морских свинок должна составлять не более 1 000 м.к.

7.2. Определение сроков формирования специфического иммунитета у морских свинок, привитых испытуемым вакцинным штаммом

Для оценки иммуногенных свойств испытуемого вакцинного штамма важно определить сроки наступления иммунитета. Испытание проводят в сравнении с контрольным вакцинным штаммом туляремий-

ного микроба 15 НИИЭГ. Культурой каждого штамма иммунизируют подкожно по 40 морских свинок дозой 5 x 10^4 м.к./мл. Заражение животных проводят двухсуточной культурой вирулентного штамма в дозе, соответствующей 1000 Dcl в объеме 1 мл на 3, 5, 7 и 14-е сут. после иммунизации (в каждый срок по 10 свинок). Одновременно с иммунизированными в каждый срок заражают по 3 контрольные (неиммунизированные) морские свинки в дозах, соответствующих 1 Dcl и 1000 Dcl. Наблюдение за зараженными животными проводят в течение 30 сут. Все контрольные морские свинки должны погибнуть в срок до 16 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологически. Полученные данные обрабатывают, определяя сутки, на которые штамм защищает опытных животных.

7.3. Определение напряженности иммунитета у морских свинок

Для определения напряженности иммунитета морских свинок массой 300—400 г иммунизируют подкожно двухсуточными агаровыми культурами испытуемого и контрольного штаммов дозой 5 x 10^4 м.к./мл. Культурой каждого штамма иммунизируют по 40 свинок. На 30-е сут. после иммунизации животных заражают подкожно культурой вирулентного штамма туляремийного микроба дозами 100, 500, 2500 и 12 500 м.к. в объеме 1 мл. На каждую заражающую дозу берут по 10 животных. Одновременно заражают 12 контрольных животных в дозах, соответствующих 1, 5, 25 и 125 м.к. в объеме 1 мл (по 3 морские свинки на каждую дозу).

Наблюдения за зараженными животными проводят в течение 30 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологическим методом. Результаты обрабатывают статистически – рассчитывают величину Dcl вирулентного штамма, полученную на иммунизированных и контрольных животных, определяют величину LD_{50}, от которой выжило 50 % иммунизированных и контрольных животных.

Затем вычисляют индекс иммунитета для морских свинок, привитых испытуемым и контрольным вакцинным штаммом туляремийного микроба. Индекс иммунитета (ИИ) – это отношение величины LD_{50} для вакцинированных животных к величине LD_{50} для контрольных животных. LD_{50} заражающего вирулентного штамма, при которой выжило 50 % морских свинок, и величина индекса иммунитета не меньше, чем таковые для контрольного вакцинного штамма.

7.4. Определение длительности иммунитета на морских свинках

Для определения сроков сохранения (длительности) иммунитета используют культуры испытуемого и контрольного вакцинных штаммов. По 40 морских свинок для испытуемого и контрольного штаммов иммунизируют подкожно дозой 5×10^4 м.к. в объеме 1 мл. Заражение животных проводят 1000 Dcl вирулентного штамма туляремийного микроба через 3, 6 и 9 мес. после иммунизации (по 10 животных через 3 и 6 мес., а оставшихся живыми – через 9 мес.). Одновременно с введением вирулентной культуры иммунизированным животным в каждый срок заражают по 6 контрольных морских свинок (3 – 1 Dcl и 3 – 1000 Dcl). О длительности иммунитета судят по количеству животных, выживших в каждый срок заражения.

Длительность иммунитета, обеспечиваемого испытуемым штаммом, не должна быть меньше, чем для контрольного вакцинного штамма туляремийного микроба 15 НИИЭГ.

Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба

Методические указания
МУ 3.3.1.2161—07

Редакторы Н. В. Кожока, Е. И. Максакова
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 05.04 07

Формат 60x88/16 Печ л 3,25
Тираж 500 экз Заказ 9

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер , д 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати издательским отделом
и тиражирован отделом информационно-технического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш , 19а
Отделение реализации, тел 952-50-89