

Л.В.Саяпина, Е.А.Соловьев, А.А.Горяев, В.П.Бондарев

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Российская Федерация

В работе исследовали 8 культур штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. высушивания, хранившихся в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Установлено, что большинство культур сохранили свои основные иммунобиологические свойства. Вместе с тем отмечено, что лиофилизация не предохраняет штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ от изменения его остаточной вирулентности при длительном хранении. Выявлено, что LD_{50} у 7 культур штамма туляремийного микроба находилась в пределах от 100 до 250 м.к., в то же время для штамма 1966 г. остаточная вирулентность составила $7,3 \cdot 10^5$ м.к. Значения иммуногенной активности изготовленных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ колебались в регламентированных пределах. Кроме этого штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1987 г. не соответствовал установленным требованиям по показателю «Специфическая безопасность», так как введение подкожно дозы $5 \cdot 10^9$ м.к./мл вызвало гибель морской свинки в течение установленного срока наблюдения. Показана необходимость постоянного поддержания стабильности исходных иммунобиологических свойств штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения.

Ключевые слова: штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, остаточная вирулентность, иммунобиологические свойства.

L.V.Sayapina, E.A.Solov'ev, A.A.Goryaev, V.P.Bondarev

Studies of Immunobiological Properties in *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 NIEG under Extended Storage Conditions

Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

Investigated have been 8 cultures of *Francisella tularensis* strain 15 NIEG (lyophilized in 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012, and 2013, respectively) stored at the State Collection of Microorganisms of the Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. It is established that the majority of cultures has maintained their immunobiological properties. However, it is of note that liophilization does not prevent *F. tularensis* strain 15 NIEG from changes in its residual virulence under extended storage. Revealed is the fact that LD_{50} for 7 cultures of tularemia microbe strain is within the limits of 100–250 microbial cells (m.c.). At the same time, residual virulence for the strain which dates back 1966 is $7.3 \cdot 10^5$ m.c. Immunogenic activity rates in *F. tularensis* 15 NIEG strain cultures range within specified limits. Apart from this, *F. tularensis* 1987 strain does not comply with the established requirements to the “specific safety”, as subcutaneous inoculation with $5 \cdot 10^9$ m.c./ml caused death of Guinea pigs within the scheduled observation time. Demonstrated is the necessity in maintaining constant stability of the original immunobiological properties in *Francisella tularensis* strain 15 NIEG under extended storage conditions.

Key words: *Francisella tularensis* strain 15 NIEG, residual virulence, immunobiological properties.

Туляремия относится к зоонозным инфекциям. Ее природные очаги встречаются во многих странах северного полушария; в России они преимущественно распространены на территории Европейской части и Западной Сибири [1, 6, 10]. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* – отличается высокой вирулентностью и контагиозностью, устойчивостью существования во внешней среде, множественностью путей передачи, длительной выживаемостью в основных факторах обитания (воздух, вода, пища, предметы обихода и др.) [5, 8, 9].

В Российской Федерации заболевания людей туляремией регистрируются в виде спорадических случаев (от 25 до 70) или эпидемических вспышек (от 800 до 1015), возникающих в годы повышения численности грызунов [3]. В 2013 г. вспышка туляремии трансмиссивного характера зарегистрирована в Ханты-Мансийске [4]. Следует отметить, что в настоящее время более 70 % случаев заболевания ту-

ляремией регистрируется у городских жителей, как правило, не привитых против этой инфекции [2].

Для специфической профилактики туляремии в России с 1946 г. используется вакцина туляремийная живая на основе штамма *F. tularensis* 15, полученного Б.Я.Эльбертом и Н.А.Гайским. С 1960-х годов вакцина изготавливается из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученного путем пассажей культуры штамма *F. tularensis* 15 через организм морских свинок. В США с 1950-х годов успешно применялась живая туляремийная вакцина на основе штамма *F. tularensis* LVS. Однако из-за высокой остаточной вирулентности у данного штамма и развития нежелательных реакций при вакцинации людей, в настоящее время за рубежом туляремийная живая вакцина не применяется [11].

Известно, что эффективность живых вакцин обеспечивается высокой иммуногенной активностью производственных штаммов. Используемый для изго-

товления туляремийной вакцины штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ обладает остаточной вирулентностью, что способствует его приживаемости, размножению и развитию активного противотуляремийного иммунитета в организме привитого [7].

Свойства вакцинного штамма при хранении могут изменяться. Особенно это важно учитывать при изготовлении новой серии маточной культуры штамма. Л.В.Сиротюк (1979) в своей работе при определении антителообразования у белых мышей, иммунизированных тремя вариантами культур штамма *F. tularensis* 15, поддерживаемых в разных учреждениях, убедительно показала их иммунологическую неравноценность по срокам образования антител в организме иммунизированных животных. Другие исследования показали, что сохранность в высушенном состоянии не защищает штамм от аттенуации и диссоциации клеток в R-форму, не обеспечивающих формирования защитного иммунитета [7]. Данное положение подтверждается тем, что используемый на протяжении многих лет штамм *F. tularensis* 15 неоднократно подвергался восстановлению иммуногенных свойств (1954, 1962 гг.), в последний раз – в 2003 г.

Указанными выше причинами обусловлена необходимость и значимость детального изучения основных иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившихся в течение длительного времени.

Целью работы является изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет хранения.

Материалы и методы

В работе использовали 8 лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. высушивания, хранившихся в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при температуре минус $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Исследуемые культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ выращивали на питательной среде для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-агар) при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Изучение иммунобиологических свойств штаммов туляремийного микроба проводили на беспородных белых мышах (масса 18–20 г) и морских свинках (масса 300–450 г). Для определения остаточной вирулентности по 10 белых мышей иммунизировали подкожно дозами от 5 до $5 \cdot 10^6$ м.к. в объеме 0,5 мл. За животными наблюдали от 3 до 21 сут. Погибших животных вскрывали, асептично извлекали селезенку, высевали в пробирки с Ft-агаром и инкубировали в течение 5 сут при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Для определения иммуногенной активности исследуемые штаммы вводили подкожно 5 морским свинкам в дозах от 5 до $5 \cdot 10^4$ м.к./мл. Через 30 сут животных инфицировали культурой вирулентного

штамма *F. tularensis* 503 дозой 1000 DCL (1 DCL – 5 м.к.). За животными наблюдали в течение 30 сут. Прививаемость штаммов изучали на 2–5-е сутки после накожного нанесения морским свинкам суспензий в дозах $5 \cdot 10^7$ и $5 \cdot 10^6$ м.к./мл. Специфическую безопасность определяли на морских свинках, которым подкожно вводили $5 \cdot 10^9$ м.к./мл, с последующим наблюдением за ними в течение 15 сут.

Результаты и обсуждение

Следует отметить, что иммуногенность живых вакцинных штаммов коррелирует с остаточной вирулентностью, снижение которой является первым сигналом изменения их иммунобиологических свойств. Известны случаи, когда культуры штамма туляремийного микроба, утратившие остаточную вирулентность, одновременно снижали или теряли свою иммуногенность [11].

Вакцинный штамм туляремийного микроба должен обладать определенной степенью остаточной вирулентности и вызывать реактивные изменения в органах лабораторных животных, интенсивность и продолжительность которых зависит от дозы введенных микробных клеток и степени их остаточной вирулентности. Результаты изучения остаточной вирулентности культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания приведены в табл. 1.

Остаточную вирулентность культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания определяли по приживаемости туляремийного микроба в органах белых мышей. Гибель животных учитывали в сроки до 21 сут после введения культур, т.к. в более поздние сроки туляремийный микроб практически не обнаруживается ни в мазках, ни в посевах. В процессе наблюдения установлено, что у всех павших на 3–10-е сутки животных, которым вводили культуры штамма туляремийного микроба в дозах 5, $5 \cdot 10^1$, $5 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^5$ и $5 \cdot 10^6$ м.к./мл отмечались типичные для туляремийной инфекции патологические изменения в разной степени выраженности. Наибольшие изменения в виде плотного инфильтрата на месте введения, гиперемии сосудов подкожной клетчатки и лимфатических узлов, а также увеличения и уплотнения печени и селезенки наблюдали при введении животным больших доз, за исключением штамма 1966 г. лиофилизации. Патоморфологические изменения в органах животных при введении, как малых, так и больших доз данного штамма были менее выражены. По мере увеличения времени с момента введения культуры штамма до гибели животных, изменения в их организме становились более умеренными, но даже в отдаленные сроки в месте введения наблюдался инфильтрат.

Для установления причин гибели животных селезенку высевали методом отпечатков на Ft-агар. Через 3–5 сут инкубации посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ культура туляремийного микроба обнаруживалась во все сроки наблюдения. Выросшую культуру идентифицировали с помощью иммуноглобули-

Результаты определения остаточной вирулентности культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания

Заражающая доза, м.к.	1953 г.		1966 г.		1987 г.		2003 г.		2012 г.		2013 г.	
	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li
5	3	0,3	0	0	0	0	3	0,3	2	0,2	1	0,1
50	6	0,6	3	0,3	9	0,9	8	0,8	8	0,8	5	0,5
500	7	0,7	1	0,1	9	0,9	9	0,9	9	0,9	9	0,9
5·10 ³	10	1,0	2	0,2	10	1,0	10	1,0	10	1,0	7	0,7
5·10 ⁴	9	0,9	3	0,3	10	1,0	9	0,9	10	1,0	10	1,0
5·10 ⁵	10	1,0	4	0,4	10	1,0	10	1,0	10	1,0	10	1,0
5·10 ⁶	10	1,0	7	0,7	10	1,0	10	1,0	10	1,0	10	1,0
LD ₅₀	250 м.к.		7,3·10 ⁵ м.к.		125 м.к.		100 м.к.		100 м.к.		100 м.к.	
Норма LD ₅₀	10 ² –2·10 ⁶ м.к.											

нов туляремийных диагностических флуоресцирующих. В мазках, окрашенных иммуноглобулинами, наблюдалось специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

В результате проведенных исследований установлено, что у 7 культур штамма отмечалась сходная степень остаточной вирулентности, которая находилась в пределах от 100 до 250 м.к. В то же время для штамма 1966 г. высушивания LD₅₀ составила 7,3·10⁵ м.к. Представленные данные (табл. 1) свидетельствуют о том, что остаточная вирулентность у изученных культур, кроме штамма 1966 г., достоверно не отличается друг от друга и соответствует регламентированным требованиям (от 100 до 2·10⁶ м.к.).

Результаты изучения иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания приведены в табл. 2.

Главным условием, определяющим возможность использования живых вакцин, является их безопасность для человека и животных. О специфической безопасности культур испытываемого штамма разных лет высушивания судили по реакции организма морских свинок на их введение. Бактерии вакцинных штаммов должны приживаться и распространяться в организме морских свинок и не должны вызывать их гибель в течение срока наблюдения. Специфическую безопасность определяли путем введения морским свинкам подкожно дозы 5·10⁹ м.к./мл исследуемых культур. После окончания срока наблюдения у всех морских свинок на месте введения отмечался некроз тканей, что допускается установленными требованиями. У отдельных животных отмечалось увеличение и уплотнение лимфатических узлов, спаянных с мягкими тканями. При этом культуры 6 штаммов были безопасными для животных, а введение штамма 1987 г. вызвало гибель морской свинки в остром периоде на 11-е сутки наблюдения. У животного при вскрытии выявлены типичные для туляремийного инфекционного процесса изменения в месте введения и внутренних органах, а также отмечались умеренное увеличение регионарных лимфатических узлов, отек

окружающей клетчатки с мелкими кровоизлияниями, изменение цвета, уплотнение и увеличение печени и селезенки.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что только одна культура штамма (1987 г.) по специфической безопасности не соответствовала предъявляемым требованиям.

Важным показателем иммуногенной активности штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ является определение его прививаемости на морских свинках при накожном применении. Вакцинный штамм при накожном нанесении на депилированный участок кожи животных доз 5·10⁶ и 5·10⁷ м.к./мл должен вызывать у них прививочную реакцию в виде появления через 2–5 сут в месте введения насечек инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм. В результате проведенных исследований выявлено, что культуры штамма туляремийного микроба вызывали умеренно выраженную прививочную реакцию размером от 5 до 10 мм, что свидетельствует о сохранности иммунологической активности испытываемых культур.

Наиболее надежным методом оценки иммуногенной активности вакцинного штамма является определение минимальной иммунизирующей дозы (ЕД₅₀) в тесте активной защиты морских свинок. Вакцинный штамм туляремийного микроба при подкожной иммунизации в дозах 5, 5·10¹, 5·10², 5·10³ и 5·10⁴ м.к./мл должен предохранять животных от гибели при заражении через 30 сут вирулентным штаммом туляремийного микроба.

Следует отметить, что значения иммуногенной активности относительно недавно изготовленных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 2012 и 2013 гг. колебались в регламентированных пределах. Установлено, что для подкожно иммунизированных морских свинок штаммом туляремийного микроба 2012 г. и через 21 сут зараженных дозой 1000 DCL штамма *F. tularensis* 503, ЕД₅₀ составила 158,5 м.к., а для штамма 2013 г. – 230 м.к., что указывает на их высокую иммуногенную активность. Проведенный ретроспективный анализ паспортов и протоколов еже-

Результаты изучения иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания

Год высушивания штамма	Прививаемость		Иммуногенность ED ₅₀ , м.к.	Специфическая безвредность
	Доза, м.к.	Размер папулы, мм		
1953	5·10 ⁷	6×8	Нет данных	Соответствует
	5·10 ⁶	6×7		
1966	5·10 ⁷	6×8	Нет данных	--«
	5·10 ⁶	6×8		
1969	5·10 ⁷	6×7	Нет данных	--«
	5·10 ⁶	5×7		
1987	5·10 ⁷	8×10	25	--«
	5·10 ⁶	5×7		
1990	5·10 ⁷	10×10	16	--«
	5·10 ⁶	10×10		
2003	5·10 ⁷	5×7	25	--«
	5·10 ⁶	8×10		
2012	5·10 ⁷	8×9	158,5 (паспортные данные)	--«
	5·10 ⁶	11×11		
2013	5·10 ⁷	10×10	230 (паспортные данные)	--«
	5·10 ⁶	7×10		
Норма показателя	5·10 ⁷	5×15	Не более 1000	При введении 5·10 ⁹ м.к. не должен вызывать гибели морской свинки
	5·10 ⁶			

годного изучения штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на базах производителей и специализированной лаборатории показал, что иммуногенность исследуемых культур разных лет высушивания и хранения была в пределах от 25 до 200 м.к. (норма не более 1000 м.к.).

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что 7 из 8 изученных культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившихся в лиофилизированном состоянии от 2 до 60 лет при температуре минус (19±1) °С, сохраняют свои основные иммунобиологические свойства в пределах регламентированных требований. Установлено, что хранение в лиофилизированном состоянии культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ не предохраняет его от изменения остаточной вирулентности, оцениваемой по LD₅₀. При этом LD₅₀ у штаммов 1953, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. лиофилизации была в пределах от 100 до 250 м.к., для вакцинного штамма, изготовленного в 1966 г., – 7,3·10⁵ м.к. Выявлено, что штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1987 г. не соответствует требованиям по показателю «Специфическая безопасность», т.к. введение подкожно дозы 5·10⁹ м.к./мл вызывало гибель морской свинки в течение установленного срока наблюдения. Представленные выше данные показывают необходимость постоянного поддержания в условиях длительного хранения стабильности иммунобиологических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для своевременного выявления изменений, характеризующих его, как вакцинный.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Косилко С.А., Бренева Н.В. Эпидемиологическая обстановка и профилактика зоонозных и природно-очаговых инфекционных болезней в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 1:62–6.
2. Марьяновская Т., Митрикова Л., Тимченко О. Случаи туляремии среди жителей Москвы. *Врач.* 2007; 12:79–80.
3. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России). *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2010; 2:17–22.
4. Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2014; 5(78):14–20.
5. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. *Инф. бол.* 2007; 5(1):67–76.
6. Попов В.П., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е., Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка в природных очагах туляремии на территории Центрального федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):10–4.
7. Сиротюк Л.В. Биологические свойства туляремийных вакцинных штаммов НИИЭГ. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1964; 10:116–20.
8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 15(40):631–46.
9. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:967–78.
10. Tarnvik A., Priebe H.S., Grunow R. Tularemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36(5):350–5.
11. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

References

1. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Kosilko S.A., Breneva N.V. [Epidemiological situation and prophylaxis of zoonotic and natural-focal infections in Siberia and Far East]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.* 2013; 1:62–6.
2. Mar'yanovskaya T., Mitrikova L., Timchenko O. [Tularemia cases

- among the population of Moscow]. *Vrach*. 2007; 12:79–80.
3. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: present day epidemiology and preventive vaccination. (To the 80th anniversary since the establishment of the first tularemia laboratory in Russia)]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2010; 2:17–22.
4. Meshcheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. [Transmissible tularemia epidemic outbreak in Khanty-Mansiisk in 2013]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2014; 5(78):14–20.
5. Nikiforov V.V., Karetkina G.N. [Tularemia: since the discovery up to the present day]. In: [Infectious Diseases]. 2007. Vol. 5. P. 67–76.
6. Popov V.P., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. [Epizootiological and epidemiological situation in tularemia natural foci in the territory of the Central Federal District of the Russian Federation from 1992 to 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):10–4.
7. Sirotyuk L.V. [Biological properties of tularemia vaccine strains НИИГ]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.* 1964; 10:116–20.
8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 15(40):631–46.
9. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:967–78.
10. Tarnvik A., Priebe H.S., Grunow R. Tularemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36(5):350–5.
11. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

Authors:

Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation.

Об авторах:

Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Поступила 13.04.15.