

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

УДК 616.98:579.841.95

Л.В. Саяпина<sup>1</sup>, Н.А. Осина<sup>2</sup>, Е.А. Нарышкина<sup>2</sup>, А.В. Федоров<sup>2</sup>, Я.М. Краснов<sup>2</sup>, Д.С. Давыдов<sup>1</sup>,  
В.П. Бондарев<sup>1</sup>**Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения**<sup>1</sup>ФБГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель** исследования – совершенствование способов верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения в современных условиях. **Материалы и методы.** В работе обобщены результаты изучения фенотипических и генетических свойств лиофилизированных культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг.), хранившихся в ГКПМ ФБГУ «НЦЭСМП» Минздрава России в течение от одного года до 60 лет. **Результаты и обсуждение.** Проведенные ранее исследования выявили, что лиофилизированные культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в основном обладали показателями, характерными для вакцинного штамма, за исключением отклонений от нормативных требований по остаточной вирулентности и специфической безопасности. Подтверждена стабильность сохранения у вакцинного штамма, хранившегося различное время в лиофилизированном состоянии, делеций в генах *pilA* и *pilE* (область дифференциации RD19) и генах, кодирующих липопротеин *lpp* (RD18). Определена специфичная для вакцинного штамма мутация C178404T (по геному штамма *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694) и разработан подход по ее определению. Полученные данные указывают на перспективность использования описанных выше делеций в регионах RD18/RD19 в совокупности с мутацией C178404T для оценки аутентичности вакцинного штамма с помощью молекулярно-генетических методов. Таким образом, проведенный ретроспективный анализ материалов о культурах вакцинного штамма туляремийного микроба с 1940-х по 2013 год и полученные экспериментальные данные позволили дополнить новыми сведениями единые требования изготовления, изучения, поддержания, хранения и движения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На основании полученных результатов коллективом авторов разработан проект методических рекомендаций федерального уровня «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

**Ключевые слова:** вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, фенотипические и генетические свойства, молекулярно-генетические методы.

Корреспондирующий автор: Саяпина Лидия Васильевна, e-mail: Sayapina@exrmed.ru.

Для цитирования: Саяпина Л.В., Осина Н.А., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Краснов Я.М., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:137–144. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

Поступила 22.02.2022. Отправлена на доработку 23.05.2022. Принята к публ. 21.09.2022.

L.V. Sayapina<sup>1</sup>, N.A. Osina<sup>2</sup>, E.A. Naryshkina<sup>2</sup>, A.V. Fedorov<sup>2</sup>, Ya.M. Krasnov<sup>2</sup>, D.S. Davydov<sup>1</sup>,  
V.P. Bondarev<sup>1</sup>**Improvement of Approaches to the Verification of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG during Long-Term Storage**<sup>1</sup>Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation;<sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to improve the methods for verifying the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG during long-term storage under current conditions. **Materials and methods.** The paper summarizes the results of studying the phenotypic and genetic properties of lyophilized cultures of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIIEG (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 and 2013) stored at SCEMAP for a period of one to 60 years. **Results and discussion.** Previous studies have revealed that freeze-dried cultures of *F. tularensis* 15 NIIEG generally had the characteristics of the vaccine strain, with the exception of deviations from the regulatory requirements for residual virulence and specific safety. The stability of preservation of deletions in the *pilA* and *pilE* genes (the region of differentiation RD19) and the genes encoding *lpp* lipoprotein (RD18) in the vaccine strain, which was stored for various periods of time in a lyophilized state, has been confirmed. The vaccine-strain-specific mutation C178404T (by the genome of *F. tularensis* LVS strain, GenBank NCBI no. CP009694) has been identified, and an approach to determine it has been developed. The data obtained are promising as regards using the above deletions in the RD18/RD19 regions in combination with the C178404T mutation to assess the authenticity of the vaccine strain using molecular genetic methods. Thus, the conducted retrospective analysis of the data on the cultures of tularemia microbe vaccine strain from the 1940s to 2013 and the gathered experimental data, made it possible to supplement the uniform requirements for the manufacture, study, maintenance, storage and movement of *F. tularensis* 15 NIIEG vaccine strain with new evidence. Based on the results obtained, the authors have drawn a draft methodological recommendations of the federal level “Vaccinal strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG: order of handling”.

**Key words:** *Francisella tularensis* 15 NIIEG vaccine strain, phenotypic and genetic properties, molecular-genetic methods.

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

*Corresponding author:* Lidiya V. Sayapina, e-mail: Sayapina@expmed.ru.

*Citation:* Sayapina L.V., Osina N.A., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., Davydov D.S., Bondarev V.P. Improvement of Approaches to the Verification of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* 15 NIIЭГ during Long-Term Storage. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:137–144. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144

*Received* 22.02.2022. *Revised* 23.05.2022. *Accepted* 21.09.2022.

Sayapina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>  
Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>  
Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>  
Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>  
Davydov D.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>  
Bondarev V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Заболевание туляремией регистрируется во многих странах мира, в том числе и в России. В настоящее время природные очаги туляремии распространены практически во всех регионах нашей страны. Большое значение в борьбе с туляремией отводится профилактическим мероприятиям, в том числе вакцинации населения.

Впервые вакцинация против туляремии проведена Л.М. Хатеневым и Г.Я. Синаем в 1931 г. в юго-восточном Казахстане глицериновой инактивированной туляремийной вакциной. Позднее Н.А. Гайский и Б.Я. Эльберт (1932–1936 гг.) доказали возможность создания стойкого иммунитета при введении живой вакцины. Используя метод аттенуации, получены два кандидата в вакцинные штаммы: *Francisella tularensis* № 15 и Ондатра IV. Штамм *F. tularensis* № 15 признан вакцинным, так как более стабилен при хранении [1, 2].

Впоследствии многократные пересевы (в течение 15 лет) штамма *F. tularensis* № 15 привели к снижению его остаточной вирулентности и, как следствие, к снижению иммуногенности. Для восстановления иммунобиологических свойств в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи проведена анимализация штамма через организм морских свинок. Полученный вариант штамма *F. tularensis* №15-восстановленный впоследствии еще дважды подвергался восстановлению иммуногенных свойств и получил название «вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ» [3–5].

В настоящее время штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ хранится в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, производство живой туляремийной вакцины осуществляется в АО «НПО «Микроген» (филиал в г. Омске).

В сложившихся современных условиях отсутствует руководящий документ, регламентирующий единые требования к порядку изготовления, изучения, поддержания и хранения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Анализ нормативных документов, в которых приведены требования к вакцинным штаммам возбудителей особо опасных инфекций, в том числе и туляремии (МУ 3.31.2161-07. Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба), показывает, что в них отсутствуют требования к генетической стабильности штамма, в описательной форме приведены технологические операции по культивированию и лиофилизации

вакцинного и кандидатов в вакцинные штаммы. При этом доступные сведения имеют разную степень детализации свойств вакцинного штамма.

Отсутствие единых подходов к алгоритму поддержания производственного штамма, используемого при изготовлении туляремийной вакцины, может привести в процессе хранения к изменению основных иммунобиологических свойств и несвоевременной их корректировке в случае выявления несоответствия отдельных показателей установленным требованиям. Актуальность проблемы подтверждается исследованиями зарубежных авторов по разработке кандидатов в вакцинные живые туляремийные штаммы с целью сопоставления известных характеристик, связанных с их аттенуацией и иммуногенной активностью [6–8].

Учитывая вышеизложенное, необходимость регламентирования нормативных требований к порядку поддержания и изучения основных свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе его хранения и поддержания не вызывает сомнений [9], что согласуется с рекомендациями ВОЗ по производству и контролю качества вакцинных препаратов для обеспечения их безопасности и эффективности [10].

На первом этапе важной составляющей является определение единых научно обоснованных подходов и требований к порядку изготовления, изучения, хранения и поддержания эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, предназначенного для производства вакцины туляремийной живой, аллергена туляремийного жидкого (Тулярин) и диагностических противотуляремийных препаратов.

**Цель работы** – совершенствование способов верификации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения.

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ нормативных документов, отражающих требования к вакцинным штаммам против особо опасных инфекций.

2. Обобщить данные, полученные при изучении фенотипических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

3. Определить наиболее информативные методы изучения генетических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для его аутентификации.

4. Разработать методические рекомендации «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

## Материалы и методы

В работе обобщены результаты изучения фенотипических и генетических свойств, а также отсутствия посторонних микроорганизмов и грибов в лиофилизированных культурах вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг.), хранившихся в ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при температуре минус  $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение от одного года до 60 лет. В процессе исследования проанализированы паспорта контроля качества 48 лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученных на базе Одесского предприятия производства бактериальных препаратов в 1980, 1987 и 1990 гг., и 28 паспортов качества – на предприятии НПО «Микроген» (филиал в Омске) за 2003–2013 гг.

Ферментативная активность культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также образование сероводорода и индола изучены с использованием питательной среды Dawns, модульного анализатора бактериологического bioMerieux VITEK® 2 Systems, аналитических карт типа bioMerieux GN (21341) и систем индикаторных бумажных (СИБ). Серологические свойства исследовали с использованием коммерческой сыворотки диагностической туляремийной сухой для РА; отсутствие посторонних бактерий и грибов – последующей оценкой однородности тинкториальных свойств культур и микроскопией мазков. Иммунобиологические свойства (остаточная вирулентность, специфическая безопасность, иммуногенность, прививаемость) штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ определяли на беспородных белых мышках (масса 18–20 г) и морских свинках (масса 300–450 г).

Исследования генетических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили методами ERIC- и RAPD-типирования в соответствии с рекомендациями авторов [11], ПЦР и фрагментного секвенирования (по общепринятой методике) в Российском противочумном институте «Микроб».

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми статистическими методами, рисунки и графики – с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2010.

## Результаты и обсуждение

До 2011 г. в Российской Федерации существовала единая система, которая определяла требования к организации производства и контроля качества иммунобиологических препаратов, в том числе и вакцин против особо опасных инфекций. При этом порядок изготовления, изучения, поддержания и хранения штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также условия его получения и использования перед каждым производственным циклом изготовления вакцины были прописаны недостаточно полно в Промышленном регламенте на вакцину туляремийную живую (утверж-

дался руководителем учреждения-производителя и согласовывался в ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

В ведущих фармакопеех мира (Европейская, Британская, Фармакопее США и др.) ввиду отсутствия производства живых вакцин против особо опасных инфекций требования к живым вакцинным штаммам отсутствуют [12, 13]. В то же время WHO Good Manufacturing Practices for biological products, WHO Expert Committee on Biological Standardization, Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (ICH), Государственная фармакопея Российской Федерации рекомендуют тщательно подходить к выбору и давать детальную характеристику вакцинным штаммам и составу вакцин [14–16].

Ранее нами изучены фенотипические, генетические свойства и иммунобиологические показатели вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившегося в лиофилизированном состоянии с 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. [17, 18]. При этом иммуногенность вакцинного штамма изучалась на базе трех профильных учреждений. Установлено, что в основном все лиофилизированные культуры вакцинного штамма обладали показателями, характерными для вакцинного штамма, используемого в производстве живой туляремийной вакцины, однако в ряде случаев наблюдались отклонения от нормативных требований по остаточной вирулентности и специфической безопасности. Результаты ежегодного изучения остаточной вирулентности штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (с 1987 по 2013 год) на производственных площадках и в специализированной лаборатории показали, что представляется необходимым снизить верхнюю границу данного показателя в сторону уменьшения: с  $2 \cdot 10^6$  м.к. до  $5 \cdot 10^3$  м.к. [19].

Известно, что иммуногенность вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ напрямую связана с его остаточной вирулентностью, которая обеспечивает приживаемость, размножение патогена в макроорганизме и формирование активного противотуляремийного иммунитета [20–23]. Полученные результаты позволили сформулировать основные требования, предъявляемые к изучению, изготовлению, хранению и поддержанию вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которые нашли отражение в проекте методических рекомендаций федерального уровня, а именно: вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ должен обладать типичными культурально-морфологическими, биохимическими, иммунобиологическими и генетическими свойствами для рода *Francisella*, вида *tularensis*, подвида *holarctica*, которые представлены в таблице.

В ходе проведения экспериментов подтверждена стабильность сохранения у вакцинного штамма, хранившегося в лиофилизированном состоянии с 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг., делеций в генах *pilA* и *pilE* (область дифференциации

Основные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ  
Basic properties of *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain

Показатели Indicators	Методы Methods	Норма Standard
Окраска по Граму Gram Staining	Микроскопический Microscopic	Грамотрицательные палочковидные или коккоидные плеоморфные бактерии Gram-negative rod-shaped or coccoid pleomorphic bacteria
Культурально-морфологические свойства Cultural and morphological properties	Бактериологический Bacteriological	SR – тип колоний (белый цвет) – не менее 80 % SR – colony type (white) – not less than 80 %
Ферментативная активность Enzymatic activity	Биохимический Biochemical	Глюкоза + (кислота) Glucose + (acid)
		Мальтоза + (кислота) Maltose + (acid)
		Левулеза + (кислота) Levuleza + (acid)
		Манноза + (кислота) Mannose + (acid)
		Глицерин – Glycerin –
		Цитруллин – Citrulline –
		Сероводород + Hydrogen sulfide +
Индол – Indole –		
Антигенные свойства Antigenic properties	Серологический, реакция агглютинации Serological, agglutination reaction	Агглютинация (крупнохлопчатый агглютинат) до титра сыворотки туляремийной Agglutination (coarse agglutinate) up to the titer of tularemia serum
Чистота культуры Purity of the culture	Отсутствие посторонних бактерий и грибов Absence of foreign bacteria and fungi	Чистая культура туляремийного микроба Pure culture of the tularemia microbe
Остаточная вирулентность Residual virulence	Биологический Biological	от $1 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^3$ м.к. from $1 \cdot 10^2$ to $5 \cdot 10^3$ m.c.
Иммуногенность Immunogenicity	Биологический Biological	ЕД <sub>50</sub> – не более 1000 м.к. ED <sub>50</sub> – no more than 1000 m.c.
Генетические свойства Genetic properties	ПЦР PCR	Наличие генетических маркеров: <i>iglBC</i> , <i>fopA</i> и др. (вид <i>Francisella tularensis</i> ), Ft-M19, <i>ISFtu2</i> и др. (подвид <i>holarctica</i> ), $\Delta 526$ п.н. <i>pilA-pilE</i> , $\Delta 1480$ п.н. <i>lpp</i> , SNP C178404T (штамм 15 НИИЭГ) Presence of genetic markers: <i>iglBC</i> , <i>fopA</i> , etc. ( <i>Francisella tularensis</i> species), Ft-M19, <i>ISFtu2</i> , etc. (subspecies <i>holarctica</i> ), $\Delta 526$ b.p. <i>pilA-pilE</i> , $\Delta 1480$ b.p. <i>lpp</i> , SNP C178404T (strain 15 NIEG)
Генетическая стабильность Genetic stability	ERIC, RAPD, полногеномное секвенирование ERIC, RAPD, whole genome sequencing	Специфичные ERIC и RAPD-профили, набор SNP и других мутаций Specific ERIC and RAPD-profiles, a set of SNPs and other mutations

RD19) и генах, кодирующих липопротеин (RD18), которые выявлены ранее при получении и анализе нуклеотидной последовательности полного генома штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS [24]. Все это указывает на перспективность использования указанных генетических маркеров для оценки аутентичности вакцинного штамма с помощью молекулярно-генетических методов [25].

Далее нами изучена стабильность определенных ранее единичных мутаций у вакцинного штамма:  $\Delta C1169122$ , G1518663T и C178404T (по

геному штамма *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694). Для подтверждения уникальности указанных полиморфизмов для вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проведен их поиск в 1025 геномах туляремийного микроба, представленных в базе данных GenBank NCBI. Анализ осуществляли с помощью программы snippy v.4.6.01025, сравнивая последовательности в формате fasta с референсным геномом штамма *F. tularensis* LVS [26].

Из описанных выше мутаций только C178404T оказалась специфичной для вакцинного штамма.

Мутации ΔC1169122, G1518663T по данным проведенного анализа встречались в геномах штаммов туляремии микроба в 73 и 97 % соответственно. Замена C178404T дополнительно выявлена в геноме штамма *F. tularensis* Tul-161\_KZ (GenBank NCBI № JAFCSH010000000), который, по уточненным данным V. Shevtsov *et al.* [27], представляет собой штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранящийся в коллекции Национального научного центра особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. При картировании ридов *F. tularensis* 15 НИИЭГ на референсный геном *F. tularensis* LVS оказалось, что данная мутация встречалась в 100 % ридов.

Полученные результаты указывают на перспективность использования полиморфизма C178404T при определении аутентичности вакцинного штамма. В связи с этим нами дополнительно к анализу *in silico* проведена оценка стабильности мутации C178404T *in vitro* при исследовании референсных штаммов туляремии микроба различных подвидов, биоваров и субпопуляций: KM3 – подвид *holarctica* биовар *Ery<sup>s</sup>*, KM4 – подвид *mediasiatica*, KM5 – подвид *holarctica* биовар *japonica*, KM6 – подвид *tularensis* субпопуляция АII, KM7 – подвид *tularensis* субпопуляция AI, KM8 – подвид *holarctica* биовар *Ery<sup>r</sup>* [28] – и штамма подвида *novicida* Utah 112. Амплификацию фрагмента, содержащего мутацию, осуществляли с использованием подобранных с помощью программы GeneRunner 6.5.52. праймеров: snpC-T\_f 5'-ACATAATCTTAACCTTGCTCAGC-3'; snpC-T\_r 5'-ATCGCTATAGTGGTAATGG-3'. Установлено, что у всех изученных штаммов туляремии микроба, кроме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, вне зависимости от подвида, биовара и субпопуляции, в позиции 178404 (по последовательности *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694) находился нуклеотид С, тогда как у вакцинного – нуклеотид Т (рисунок).

Полученные данные указывают на перспективность использования описанных выше делеций в регионах RD18/RD19 в совокупности с мутацией C178404T для оценки аутентичности вакцинно-

го штамма с помощью молекулярно-генетических методов.

Для определения генетической стабильности *F. tularensis* 15 НИИЭГ дополнительно к ERIC- и RAPD-типированию представляется перспективным использование полногеномного секвенирования. Предложенный подход при наличии технической возможности выполнения позволит в полной мере оценить изменения в геноме вакцинного штамма и определить его аутентичность в процессе хранения в лиофилизированном состоянии, при анимализации и подготовке последующей серии вакцинного штамма. В дальнейшем предстоит определить место и роль молекулярно-генетических методов на всех технологических этапах производства вакцины туляремии живой.

Производство вакцины туляремии живой осуществляется с использованием лиофилизированной культуры эталонной линии вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, изученной по основным показателям перед началом каждого производственного цикла (таблица). Особо хотелось бы отметить необходимость перед воспроизведением культуры вакцинного штамма на базе предприятия – изготовителя туляремии вакцины его анимализации путем пассажа через организм морской свинки. Как пример, в Омске без проведения анимализации на животных в 2001 г. была изготовлена новая серия штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которая не соответствовала нормативным требованиям по показателю «Специфическая активность»: превышена концентрация – 250·10<sup>10</sup> микробных клеток/мл, снижена жизнеспособность микробных клеток и иммуногенность, что привело к выбраковке серии.

Учитывая вышеизложенное, сотрудниками специализированной лаборатории ГИСК им. Л.А. Тарасевича предложены методические подходы по проведению анимализации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомендовано включить их в Промышленный регламент производства. Введение данного этапа позволило получить серию вакцинного штамма в 2003 г., которая полностью соответствовала установленным требованиям и ис-

#15NIEG	CAA	TTA	ACC	AAA	AAT	CCA	AAG	TAG	TCA	TCT	TTT	ATG	TAA	[312]
#LVS	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#KM-8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]
#Utah 112	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	[312]

Анализ фрагмента генома штаммов туляремии микроба различных подвидов, биоваров, субпопуляций и вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, содержащего мутацию C178404T (по нуклеотидной последовательности *F. tularensis* LVS, GenBank NCBI № CP009694):

KM-3 – подвид *holarctica* биовар *Ery<sup>s</sup>*; KM-4 – подвид *mediasiatica*; KM-5 – подвид *holarctica* биовар *japonica*; KM-6 – подвид *tularensis* субпопуляция АII; KM-7 – подвид *tularensis* субпопуляция AI; KM-8 – подвид *holarctica* биовар *Ery<sup>r</sup>*; Utah 112 – подвид *novicida*

Analysis of the genome fragment of tularemia microbe strains of various subspecies, biovars, subpopulations and vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG containing the C178404T mutation (according to the sequence of *F. tularensis* LVS GenBank NCBI No. CP009694):

KM-3 – subspecies *holarctica* biovar *Ery<sup>s</sup>*; KM-4 – subspecies *mediasiatica*; KM-5 – subspecies *holarctica* biovar *japonica*; KM-6 – subspecies *tularensis* subpopulation AII; KM-7 – subspecies *tularensis* subpopulation AI; KM-8 – subspecies *holarctica* biovar *Ery<sup>r</sup>*; Utah 112 – subspecies *novicida*

пользовалась при производстве туляремийной живой вакцины с 2004 г.

Для подтверждения стабильности основных свойств вакцинного штамма необходимо предусмотреть проведение его постоянного изучения в течение регламентируемого срока годности (10 лет). В случае выявления изменений нормы показателей, характеризующих штамм как вакцинный, следует принимать своевременные меры для восстановления или подтверждения типичных фенотипических, генетических и иммунобиологических свойств.

Кроме этого, обобщена информация о надлежащих условиях проведения работ и хранении вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Работы по изготовлению вакцинного штамма должны выполняться в производственных помещениях, соответствующих правилам надлежащей производственной практики (GMP). Работы по контролю вакцинного штамма необходимо осуществлять в специальном помещении, где не проводят работы и хранение с использованием иных биологических агентов, в том числе с ПБА I–IV групп патогенности. К работе с вакцинным штаммом допускается квалифицированный персонал, владеющий методами пассирования, изготовления и контроля вакцинного штамма. Персонал, непосредственно занятый в изготовлении штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, должен быть привит вакциной туляремийной живой и проходить периодические медицинские осмотры в сроки, утвержденные руководителем предприятия – изготовителем препарата.

Ампулы с лиофилизированными эталонной и производственной культурами вакцинного штамма хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России в отдельно выделенном помещении, где не хранятся другие культуры микроорганизмов и иммунобиологические препараты, в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °С. Не допускается хранение в одной морозильной камере вакцинных штаммов других видов микроорганизмов. Металлические пеналы и морозильные камеры, в которых хранится эталонная линия вакцинного штамма, должны быть опечатаны печатями сотрудников, осуществляющих оценку качества туляремийной вакцины живой, и Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности.

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ материалов о культурах вакцинного штамма туляремийного микроба с 1940-х по 2013 год и экспериментальные данные, полученные в последние годы, позволили дополнить новыми сведениями единые требования изготовления, изучения, поддержания, хранения и движения (выдачи) вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ к организациям, осуществляющим производство и выпуск препаратов для профилактики и диагностики туляремии, выполняющим контроль их качества и безопасности,

а также к специалистам учреждений, проводящих научные исследования по разработке профилактических и диагностических противотуляремийных препаратов.

На основании проведенных исследований и полученных результатов коллективом авторов (ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора) разработан проект методических рекомендаций федерального уровня «Вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: порядок обращения».

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

#### Список литературы

1. Гайский Н.А., Эльберт Б.Я. О механизме инфекции и иммунитета при экспериментальной туляремии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1941; 12:37–42.
2. Гайский Н.А., Хижинская О.П. Первые итоги применения живой туляремийной вакцины. *Известия Иркутского государственного противочумного института Сибири и Дальнего Востока*. 1946; 6:10–5.
3. Сиротюк Л.В. Биологические свойства туляремийных вакцинных штаммов НИИЭГ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1964; 10:116–20.
4. Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С., Угловой Г.П., Салтыков Р.А., Сиротюк Л.В., Сильченко В.С., Капцын М.С., Левачева З.А., Кочуркова С.А., Бобылкова Т.В., Баранчиков В.Д., Веденева Е.В., Егорова Л.С., Иванов В.С., Баранова Н.К., Денисова В.Д., Шельмовер Р.С., Хомутова Н.В., Куцерьб Г.Г., Паньшева М.Д., Пелехова К.И., Красицкая З.И., Назарова М.Г., Красникова Е.И., Штучная А.А., Владимирова А.И., Коржева В.С. Сравнительное испытание на людях вариантов вакцинного туляремийного штамма 15 Гайского. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1971; 5:55–7.
5. Олсуфьев Н.Г. Итоги и перспективы изучения и применения в СССР живой туляремийной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1967; 5:3–10.
6. Pasetti M.F., Cuberos L., Horn T.L., Shearer J.D., Matthews S.J., House R.V., Szein M.B. An improved *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) is well tolerated and highly immunogenic when administered to rabbits in escalating doses using various immunization routes. *Vaccine*. 2008; 26(14):1773–85.
7. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
8. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
9. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 2:107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
10. WHO Technical Report Series No. 927. WHO Expert Committee On Biological Standardization (54th report). Geneva, 2005. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275>.
11. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferrí E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1016-1022.2000.
12. Sunagar R., Kumar S., Franz B.J., Gosselin E.J. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016; 6:9–23. DOI: 10.2147/VDT.S85545.
13. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

14. WHO good manufacturing practices for biological products, Annex 2, TRS No. 999. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-999-WHO-gmp-for-biological-products>.
15. Руководства ИСН для фармацевтической отрасли. Качество. СПб.: ЦОП «Профессия»; 2017. 768 с.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.
17. Соловьев Е.А., Саяпина Л.В., Осина Н.А., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:91–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-91-95.
18. Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2:87–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-87-91.
19. Саяпина Л.В., Хорева И.И., Байдалова Н.П., Горяев А.А., Давыдов Д.С., Поступайло В.Б., Меркулов В.А. Оценка остаточной вирулентности вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ по данным многолетних наблюдений. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
20. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 2:17–22.
21. Избанова У.А., Куница Т.Н., Лухнова Л.Ю. Достижения в области специфической профилактики туляремии. *Medicine (Almaty)*. 2016; 10:49–59.
22. Stinson E., Smith L.P., Cole K.S., Barry E.M., Reed D.S. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model. *Pathog. Dis.* 2016; 74(7):ftw079. DOI: 10.1093/femspd/ftw079.
23. O'Malley K.J., Bowling J.D., Stinson E., Cole K.S., Mann B.J., Namjoshi P., Hazlett K.R.O., Barry E.M., Reed D.S. Aerosol prime-boost vaccination provides strong protection in outbred rabbits against virulent type A *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0205928. DOI: 10.1371/journal.pone.0205928.
24. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
25. Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Баданин Д.В., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Меркулов В.А., Олефир Ю.В., Кутырев В.В. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.
26. Seemann T Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy?ysclid=18bilb7r802266956>.
27. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhnova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.
28. Осина Н.А., Уткин Д.В., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор штаммов бактерий вида *Francisella tularensis* для получения комплекта контрольных ДНК препаратов, комплект ДНК препаратов для генно-диагностических исследований. Патент РФ № 2443772, опублик. 27.02.2012. Бюл. № 6.
- Shtuchnaya A.A., Vladimirova A.I., Korzheva V.S. [Comparative human trial of variants of Gaisky tularemia vaccine strain 15]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1971; (5):55–7.
5. Olsuf'ev N.G. [Results and prospects of studying and using the live tularemia vaccine in the USSR]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1967; (5):3–10.
6. Pasetti M.F., Cuberos L., Horn T.L., Shearer J.D., Matthews S.J., House R.V., Szein M.B. An improved *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) is well tolerated and highly immunogenic when administered to rabbits in escalating doses using various immunization routes. *Vaccine*. 2008; 26(14):1773–85.
7. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccin.* 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
8. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
9. Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. [The current state of vaccinal prevention of particularly dangerous infections]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
10. WHO Technical Report Series No. 927. WHO Expert Committee on Biological Standardization (54th report). Geneva, 2005. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9241209275>.
11. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferri E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1016-1022.2000.
12. Sunagar R., Kumar S., Franz B.J., Gosselin E.J. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine (Auckl)*. 2016; 6:9–23. DOI: 10.2147/VDI.S85545.
13. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.
14. WHO good manufacturing practices for biological products, Annex 2, TRS No. 999. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-999-WHO-gmp-for-biological-products>.
15. [ICH Guidelines for the Pharmaceutical Industry. Quality]. St. Petersburg; 2017. 768 p.
16. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. Moscow; 2018.
17. Solov'ev E.A., Sayapina L.V., Osina N.A., Davydov D.S., Bondarev V.P. [Characterization of phenotypic and genetic properties of *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG with long shelf life]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):91–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-91-95.
18. Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. [Study of the immunobiological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG under long-term storage conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 2:87–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-87-91.
19. Sayapina L.V., Khoreva I.I., Baidalova N.P., Goryaev A.A., Davydov D.S., Postupailo V.B., Merkulov V.A. [Evaluation of the residual virulence of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG based on long-term observations]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (1):98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
20. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: modern epidemiology and vaccination (on the occasion of the 80th anniversary of the creation of the first tularemia laboratory in Russia)]. *Epidemiologia I Vaksynoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2010; (2):17–22.
21. Izbanova U.A., Kunitsa T.N., Lukhnova L.Yu. [Advances in specific prevention of tularemia]. *Medicine (Almaty)*. 2016; (10):49–59.
22. Stinson E., Smith L.P., Cole K.S., Barry E.M., Reed D.S. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model. *Pathog. Dis.* 2016; 74(7):ftw079. DOI: 10.1093/femspd/ftw079.
23. O'Malley K.J., Bowling J.D., Stinson E., Cole K.S., Mann B.J., Namjoshi P., Hazlett K.R.O., Barry E.M., Reed D.S. Aerosol prime-boost vaccination provides strong protection in outbred rabbits against virulent type A *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0205928. DOI: 10.1371/journal.pone.0205928.
24. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.

## References

- Gaisky N.A., Elbert B.Ya. [On the mechanism of infection and immunity in experimental tularemia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1941; (12):37–42.
- Gaisky N.A., Khizhinskaya O.P. [The first results of the use of live tularemia vaccine]. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Protivochumnogo Instituta Sibiri i Dal'nego Vostoka [Proceedings of the Irkutsk State Anti-Plague Institute of Siberia and Far East]*. 1946; (6):10–5.
- Sirotyuk L.V. [Biological properties of tularemia vaccine strains NIEG]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1964; (10):116–20.
- Olsufiev N.G., Emelyanova O.S., Uglovoi G.P., Saltykov R.A., Sirotyuk L.V., Sil'chenko V.S., Kaptsyn M.S., Levacheva Z.A., Kochurkova S.A., Bobylkova T.V., Baranchikov V.D., Vedeneva E.V., Egorova L.S., Ivanov V.S., Baranova N.K., Denisova V.D., Shelmover R.S., Khomutova N.V., Kutseryb G.G., Panysheva M.D., Pelehova K.I., Krasitskaya Z.I., Nazarova M.G., Krasnikova E.I.,

25. Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Al'khova Zh.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V., Kutyrev V.V. [Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.

26. Seemann T Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy?ysclid=l8bilb7rp802266956>.

27. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.

28. Osina N.A., Utkin D.V., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. [A panel of bacterial strains of the *Francisella tularensis* species for obtaining a set of control DNA preparations, a set of DNA preparations for genetic diagnostic studies]. RF patent No. 2443772, publ. 02/27/2012. Bull. No. 6.

**Authors:**

*Sayapina L.V., Davydov D.S., Bondarev V.P.* Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. Building 2, 8, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

*Osina N.A., Naryshkina E.A., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

**Об авторах:**

*Саяпина Л.В., Давыдов Д.С., Бондарев В.П.* Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2.

*Осина Н.А., Нарышкина Е.А., Федоров А.В., Краснов Я.М.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).