3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба

Методические указания
МУ 3.3.1.1113 — 02

gost.e-ecolog.ru

ББК 52.6
О75

О75 **Основные** требования к вакцинным штаммам чумного микроба: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.— 63 с.

1. Разработаны: Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (Т. И. Анисимова, Л. В. Саяпина, Г. М. Сергеева), Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (И. В. Исупов, Р. А. Белобородов, Л .В. Самойлова, А .П. Анисимов, М. Ю. Ледванов, Г. П. Шведун, С. Ю. Задумина, А. Ф. Касьян, А. Л. Кравцов), Научно-исследовательским институтом микробиологии министерства обороны РФ (И. В. Маракулин, А. В. Ежов, Е. М. Дармова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Минздраве России (протокол № 12 от 14.02.02).

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 2 марта 2002 г.

4. Введены взамен методических указаний «Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба», утв. Минздравом СССР 08.08.74.

ББК 52.6

Редакторы Кожока Н. В., Максакова Е. И.
Технические редакторы Климова Г. И., Григорьев А. А.

Подписано в печать 06.08.02
Формат 60x88/16 Печ. л. 4,0
Тираж 3000 экз. Заказ 44

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11. Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2002
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002

Содержание

1. Область применения ... 4
2. Нормативные ссылки ... 4
3. Общие положения ... 6
4. Идентификация штамма по видовым признакам ... 6
5. Определение степени остаточной вирулентности (безвредности) испытуемого штамма чумного микроба по распространяемости и приживаемости в органах морских свинок ... 8
6. Оценка безвредности исследуемого штамма *Y. pestis* в опытах на белых мышах ... 10
7. Определение стойкости утраты вирулентности бактериями исследуемого штамма в опытах на морских свинках ... 10
8. Определение реактогенности штамма для морских свинок (прижизненные наблюдения) при подкожном способе введения ... 11
9. Определение безвредности исследуемых вакцинных штаммов для морских свинок по морфологическим показателям при подкожном способе введения ... 11
10. Определение безвредности и реактогенности испытуемого штамма при аэрогенной иммунизации морских свинок ... 20
11. Оценка реактогенности испытуемого штамма по стрессорному действию ... 22
12. Определение влияния испытуемого штамма на иммунную систему морских свинок ... 22
13. Иммуногенная активность штамма ... 23
14. Испытания стабильности штамма в производственных условиях ... 25
15. Испытания вакцины чумной сухой на людях ... 25

Приложение 1. Методики идентификации штаммов чумного микроба по видовым признакам ... 27
Приложение 2. Определение степени остаточной вирулентности (безвредности) исследуемого штамма по распространяемости и приживаемости в органах и тканях при подкожном способе введения морским свинкам ... 37
Приложение 3. Определение стойкости утраты вирулентности штаммами чумного микроба ... 43
Приложение 4. Методика определения безвредности вакцинного штамма чумного микроба при аэрогенной иммунизации морских свинок ... 44
Приложение 5. Методика определения реактогенности вакцинного штамма чумного микроба по стрессорному действию ... 47
Приложение 6. Методы определения влияния вакцинного штамма чумного микроба на иммунную систему морских свинок ... 51
Приложение 7. Методы определения иммуногенной активности вакцинного штамма чумного микроба ... 63

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации –
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
2 марта 2002 г.
МУ 3.3.1.1113—02
Дата введения – 1 мая 2002 г.

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба

Методические указания

1. Область применения

1.1. Методические указания «Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба» разработаны в помощь специалистам научно-исследовательских учреждений, осуществляющих разработку и контроль вакцинных штаммов.

2. Нормативные ссылки

В настоящих методических указаниях использованы ссылки на следующие документы.

2.1. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан.

2.2. Методические указания «Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба», утверждены Минздравом СССР 8.08.74.

2.3. РД 42—28—24—88 «Медицинские иммунобиологические препараты. Основные термины и определения».

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

2.5. Положение о государственной регистрации, сертификации и государственном контроле за качеством медицинских иммунобиологических препаратов в Российской Федерации. Постановление ГКСЭН от 3.07.94 № 5.

2.6. Санитарные правила СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности».

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

Введение

Возбудитель чумы относится к особо опасным микроорганизмам I группы патогенности. Для профилактики чумы в России применяют живую вакцину, поэтому безопасность (безвредность) вакцинных штаммов в основном решается на этапе доклинических лабораторных государственных испытаний. Основной задачей настоящих методических указаний является изложение обязательных требований к штаммам чумного микроба – кандидатам в вакцинные, критериев оценки и методов исследования, позволяющих отобрать для последующих клинических испытаний безопасные и высокоиммуногенные штаммы чумного микроба.

Все испытания аттенуированных штаммов чумного микроба, перспективных в качестве вакцинных, проводят в сравнении с эталонным вакцинным штаммом чумного микроба EV линии НИИЭГ, получаемым в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

На основании результатов государственных лабораторных (доклинических) испытаний, одобренных национальным органом контроля (ГИСК им. Л. А. Тарасевича) и Комитетом медицинских и иммунобиологических препаратов (МИБП), о соответствии нового штамма *Y. pestis* требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам данными методическими указаниями, Министерство здравоохранения Российской Федерации разрешает проведение клинических ограниченных, затем государственных испытаний на добровольцах живой вакцины, приготовленной на основе этого штамма, по программе, согласованной с национальным органом контроля и Комитетом МИБП. После утверждения Министерством здравоохранения испытуемого штамма в качестве нового

вакцинного, дальнейшие этапы внедрения живой вакцины проводят в соответствии с санитарными правилами СП 3.3. 2.561—96 «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов».

3. Общие положения

3.1. Для изготовления живой вакцины используют штаммы чумного микроба, стабильно утратившие патогенность для человека и животных, проявляющие остаточную вирулентность для мышей и, в больших дозах, для морских свинок.

3.2. Все исследования по испытанию кандидатов в вакцинные штаммы чумного микроба должны проводиться в изолированном помещении, в котором не должно быть микроорганизмов I—II групп патогенности.

3.3. Испытуемый и контрольный эталонный вакцинный штаммы чумного микроба должны быть зашифрованы специалистами, не принимающими участия в проведении исследований.

3.4. Вся работа с зашифрованными испытуемым и контрольным штаммом до отнесения испытуемого штамма к III группе патогенности должна проводиться как с микроорганизмами I группы патогенности.

3.5. Для испытаний используют двухсуточные агаровые культуры второй генерации, полученные из лиофилизированных культур испытуемого штамма и контрольного вакцинного штамма чумного микроба EV линии НИИЭГ из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Концентрацию клеток в микробных взвесях агаровых культур определяют по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42—28—59—86П), 10 единиц которого эквивалентны $1 \cdot 10^9$ микробных клеток (м. к.) в 1 мл.

4. Идентификация штамма по видовым признакам

4.1. Чумной микроб относится к роду *Yersinia*, вида *pestis*. *Y. pestis* – облигатный паразит, природный ауксотроф с факультативным анаэробным типом дыхания, грамотрицательная палочка. Чумные микробы ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, галактозу, арабинозу, ксилозу, маннит, мальтозу, не ферментируют сахарозу, лактозу и рамнозу (за исключением Горноалтайских и Закавказских штаммов); не образуют индол, не гидролизуют мочевину, океанические штаммы не ферментируют глицерин, континентальные – ферментиру-

ют. Характерный R-тип колоний формируется на 2—4 сутки роста при оптимальной для развития температуре (28 ± 1) °С. Лизируются чумным диагностическим фагом Л-413с.

4.2. Возбудитель чумы имеет три собственные плазмиды-пестициногенности (pPst), кальцийзависимости (pCad) и плазмиду pFra, имеющие молекулярные массы соответственно ≈ 6, ≈ 47 и ≈ 60 MD. Плазмида pPst детерминирует продукцию пестицина, иммунность к нему, синтез активатора плазминогена, отвечающего за плазмокоагулазную и фибринолитическую активности. Оба продукта плазмиды pPst являются видоспецифическими белками, имеют важное диагностическое значение. Плазмида pCad определяет зависимость роста клеток *Y. pestis* при температуре (37 ± 1) °С от наличия в питательной среде ионов кальция, а так же детерминирует биосинтез V антигена и Yops (*Yersinia* outer membrane proteins – белков внешней мембраны). Штаммы лишенные этой плазмиды, авирулентны. Протективным действием для белых мышей обладает V антиген. Плазмида pCad не является видоспецифической, ее варианты обнаруживают у всех патогенных представителей рода *Yersinia*, причем эти плазмиды обладают значительной степенью генетической гомологии. Однако, несмотря на значительное функциональное и структурное подобие, на видовом уровне эти плазмиды различаются по способности обеспечивать продукцию отдельных белков внешних мембран, которые имеют ведущее значение как в выражении вирулентности возбудителя, так и в видовой специфичности. Плазмида pFra детерминирует биосинтез капсульного антигена *Y. pestis* (FI) и «мышиного» токсина (Tox). Антиген FI является основным иммуногеном *Y. pestis*. Оба антигена относятся к видоспецифическим.

Видовая специфичность чумного микроба определяется в основном генами, имеющими плазмидную локализацию.

Испытуемый штамм, предлагаемый в качестве вакцинного, должен соответствовать или превосходить эталонный вакцинный по показателю иммуногенности, соответствовать контрольному штамму по показателям безвредности и реактогенности или быть более безопасным, а по некоторым несущественным характеристикам, которые характеризуют его как представителя вида или разновидности *Y. pestis*, могут отличаться от него.

4.3. Исследуемый штамм – кандидат в вакцинные, должен:

- лизироваться чумным бактериофагом Л-413С;
- быть типичным по культурально-морфологическим свойствам;

• титр FI испытуемого штамма не должен быть меньше аналогичного показателя, полученного с культурой контрольного штамма *Y. pestis* EV, выращенного в аналогичных условиях;

• доля кальцийнезависимых мутантов в популяции культур чумного микроба, пропассированных через организм лабораторных животных и не подвергавшихся длительному хранению или каким-либо физическим воздействиям, не должна превышать 0,3 %;

• не должен уступать контрольному штамму по фибринолизин-плазмокоагулазной активности;

• испытуемый и контрольные штаммы не должны обладать способностью к пигментсорбции;

• испытуемые вакцинные штаммы аналогично эталонному штамму EV на электрофореграмме должны иметь 3 полосы плазмидной ДНК, соответствующие pFra (60 MD), pCad (47 MD) и pPst (6 MD).

Методики определения видовых признаков испытуемого и контрольного штаммов приведены в прилож. 1.

5. Определение степени остаточной вирулентности (безвредности) испытуемого штамма чумного микроба по распространяемости и приживаемости в органах морских свинок

Методика определения безвредности нового вакцинного штамма приведена в прилож. 2.

О безвредности культуры испытуемого штамма судят по реакции организма морских свинок на ее введение, по приживаемости и распространяемости в организме, по выявленным у подопытных морских свинок патоморфологическим изменениям, степени выраженности и обратимости. В качестве контроля в этих экпериментах используют группу морских свинок, привитых культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV и обследуемых аналогичным образом.

5.1. Испытуемый и эталонный вакцинный штаммы чумного микроба не должны вызывать гибель морских свинок, привитых $1 \cdot 10^2$—$1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к.

5.2. Вакцинные штаммы чумного микроба должны обладать определенной степенью остаточной вирулентности, т. е. в течение некоторого времени размножаться, распространяться и задерживаться в организме привитых животных, в результате чего развивается доброкачественный вакцинальный процесс. Хорошо размножающиеся и приживающи-

еся в организме лабораторных животных вакцинные штаммы *Y. pestis* обладают более выраженной иммуногенностью по сравнению с культурами, у которых слабо проявляются эти свойства.

5.3. Бактерии вакцинных высокоиммуногенных штаммов *Y. pestis* 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 *Y. pestis* могут приживаться в организме морских свинок и выявляются в высевах из места введения и из регионарных лимфатических узлов в течение 20—30 сут. Поэтому микробы высокоиммуногенного вакцинного штамма обязательно должны обнаруживаться при высевах на питательные среды из места введения культуры и регионарных лимфатических узлов. При введении $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. возможно также выделение их в течение первых 10—15 сут из селезенки и из печени.

5.4. Для вакцинного штамма чумного микроба при подкожном методе введения допустимо выделение микробов:

- из места введения и регионарного лимфатического узла до 20—30 сут. (в единичных случаях более 30 сут.) при дозах $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. в виде сливного (4+) или обильного роста (3+), при дозе 10^7 м. к. – около 100—200 колоний (2+) и при дозе 10^2 м. к. – до 10 и иногда более колоний (1+);
- в посевах печени и селезенки от животных, привитых $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. в течение 2 недель может вырасти более 100 колоний, привитых 10^7 м. к. – около 50—100 колоний, от морских свинок, привитых 10^2 м. к., из печени и селезенки чумной микроб обычно не выделяется;
- в посевах из легких, крови и костного мозга, как правило, не должно быть роста чумных микробов. У отдельных животных (не более 1 %) в течение 3—5 сут., после введения массивных доз исследуемой культуры ($2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к.), в посевах из легких, крови или костного мозга могут вырастать единичные колонии *Y. pestis*.

5.5. При введении животным культуры штаммов с недостаточно стабилизированным клеточным составом в массивных дозах ($2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к.) большая часть клеток, потерявшая вирулентность, ведет себя в организме, подобно живой вакцине, и уже в первые дни индуцирует формирование специфического иммунитета. На фоне приобретенного иммунитета оставшиеся в культуре вирулентные клетки могут не вызывать развития чумной инфекции («феномен переживания» микробов), потому что дей-

ствие их нейтрализуется уже сформировавшимися специфическими защитными механизмами хозяина, и животные, как правило, выживают. В этом случае возможно ошибочное заключение о соответствии исследуемого штамма по признаку безвредности требованиям, предъявляемым к вакцинным.

Только в том случае, когда в популяции исследуемого штамма много вирулентных клеток, или большая часть клеток недостаточно снизила свою вирулентность, или организм подопытных животных ослаблен и не успевает приобрести специфическую резистентность, животное погибает от чумы или переболевает ей. При определении безвредности нового вакцинного штамма для выявления в его популяции вирулентных клеток необходимо, как сказано выше, проводить испытания культур на животных не только путем введения массивных ($2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к.), но средних (10^7 м. к.) и малых (10^2 и $5 \cdot 10^2$ м. к.) доз. Малые дозы чумного микроба с недостаточно сниженной вирулентностью могут вызывать гибель морских свинок или недопустимые изменения в их органах и тканях.

6. Оценка безвредности исследуемого штамма *Y. pestis* в опытах на белых мышах

Культуры вакцинных штаммов чумного микроба при подкожном введении белым мышам массой 18—20 г в дозах 10^2, 10^3, 10^5 и 10^7 м. к. не должны вызывать их гибели. Каждую дозу вводят 10 животным. Наблюдение за ними проводят в течение 20 сут. В случае гибели белых мышей их исследуют патологоанатомически, морфологически, бактериологически. Методика иследования приведена в п.п. 4 и 5 прилож. 2.

7. Определение стойкости утраты вирулентности бактериями исследуемого штамма в опытах на морских свинках

Методика проведения пассажей приведена в прилож. 3.

В результате 10-кратного подкожного пассирования исследуемых культур через организм морских свинок не должна повыситься остаточная вирулентность штамма, не должны изменяться его культуральные, морфологические и биохимические свойства; плазмидный профиль. Степень приживаемости микробов в организме может усилиться, но вакцинный штамм чумного микроба в организме морских свинок и бе-

лых мышей не должен реверсировать в вирулентную форму, способную в организме восприимчивого животного вызывать изменения, свойственные чумной инфекции.

8. Определение реактогенности штамма для морских свинок (прижизненные наблюдения) при подкожном способе введения

Методика определения реактогенности вакцинного штамма для морских свинок приведена в прилож. 2.

8.1. Высокоиммуногенный вакцинный штамм чумного микроба клинически должен вызывать 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. Малая доза (10^2 м. к.) вызывает 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 увеличены, но должны быть подвижными, т. е. не спаянными с окружающими мягкими тканями.

8.2. При испытании массивных доз ($2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к.) у отдельных животных возможно повышение температуры тела на 1,5—2 °С. Среднее повышение температуры тела для группы морских свинок (30—40 голов), которым было введено 10^2, 10^7, $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. исследуемого штамма, не должно превышать 1 °С. К 7—12 дню после введения вакцинного штамма температура тела морских свинок должна снизиться до нормальных исходных значений.

8.3. В ответ на введение $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. вакцинного штамма чумного микроба в первые 5 сут может снижаться масса тела морских свинок. К 6—7 суткам 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, может наблюдаться увеличение, уплотнение и спаянность регионарных лимфатических узлов с мягкими тканями.

9. Определение безвредности исследуемых вакцинных штаммов для морских свинок по морфологическим показателям при подкожном способе введения

Безвредность испытуемых штаммов 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 в месте введения культуры, в регионарных, контрлатеральных и отдаленных лимфатических узлах, а также во внутренних органах (печени, селезенке, почках). Методика вскрытия и исследования морских свинок приведена в прилож. 2.

9.1. Общие критерии при оценке безвредности испытуемых штаммов.

9.1.1. Испытуемый штамм не может быть признан вакцинным, если он в соответствующих дозах при всех равных условиях вызывает у морских свинок чаще более выраженные или менее доброкачественные изменния (см. ниже), чем контрольный штамм EV.

9.1.2. Вакцинный штамм, введенный морским свинкам в дозах $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^9$ м. к., вызывает максимальное развитие островоспалительных изменений примерно к 7-м суткам, их стихание с преобладанием продуктивного компонента к 10—12 суткам и полной резорбцией или заживлением без грубых рубцовых изменений к концу срока наблюдения (30—45 сутки);

9.1.3. При введениии культуры в малой дозе (10^2 м. к.) сроки нарастания и стихания острых признаков могут затягиваться, соответственно до 14 и 21 суток.

9.1.4. Обнаруженные при малом и среднем увеличениях микроскопа типичные скопления чумных микробов в воспалительных очагах, вне их и внутри сосудов, даже очень мелкие и единичные, считаются абсолютно недопустимым признаком.

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 10^2, 10^7 и $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимо: незначительное или умеренное диффузное или очаговое полнокровие тканей в остром периоде процесса (до 10—12 суток); ограниченные участки полнокровия крупных вен, немногочисленные кровоизлияния, полностью разрешающиеся к 30-м суткам.

При введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. преимущественно в остром периоде (7—10-е сутки) не более чем в половине случаев также

допустимы: участки воспалительного уплотнения (инфильтраты) размерами до 1,0 · 1,5 см, в отдельных случаях более крупные; серозное воспалительное пропитывание («отек») тканей бедра и паховой области на месте введения культуры, но без распространения отека на прилежащие области (брюшная и грудная стенка, контрлатеральная паховая область) очаги гнойной инфильтрации и кровоизлияния диаметром до 0,5 см. В единичных случаях (не более 3) допустимы: крупные кровоизлияния; очаги некроза до 0,5—0,7 см в диаметре; осумкованные и инкапсулированные абсцессы с гнойной полостью до 0,5 см в диаметре; язвы и свищи с гнойным отделяемым.

Все вышеуказанные изменения в основном должны разрешаться к 30-м суткам. Допустимы незначительные остаточные явления (фиброз, небольшие рубцовые изменения) у единичных животных через 45 сут.

При введении испытуемой культуры в дозе 10^7 м. к. у отдельных (3—5) животных допустимы: участки воспалительного уплотнения (инфильтраты) размерами не более 0,5—0,7 см; умеренный воспалительный «отек» бедра и паховой области с той же стороны; очаги ограниченной гнойной инфильтрации без расплавления тканей и кровоизлияния до 0,5 см в диаметре у единичных животных (1—3).

При введении испытуемой культуры в дозе 10^2 м. к. допустимы только изменения, возможность возникновения которых описана в начале параграфа. Следует обращать внимание на возможность возникновения осумкованных и инкапсулированных абсцессов в тканях в месте введения в поздние сроки (до 45 сут), такие изменения характерны для недостаточно аттенуированных штаммов, и возникновение их не допустимо при введении исследуемой культуры в дозе 10^2 м. к.

Гистологические изменения. При введении культуры исследуемого штамма во всех указанных дозах допустимы: воспалительные инфильтраты из лейкоцитов (ПМН-лейкоцитов); накопление истинных эозинофилов здесь, а также в других воспалительных очагах не является недопустимым признаком; участки грануляционной ткани без гнойной инфильтрации и расплавления, в т. ч. рубцующейся у половины всех взятых в опыт животных. При введении культуры исследуемого штамма в дозе 10^2 м. к. указанные изменения могут наблюдаться у единичных животных (2—3).

Кроме того, при введении культуры исследуемого штамма в дозах $1 \cdot 10^7$—$2 \cdot 10^9$ м. к. не более чем у половины опытных животных допустимы: инфильтраты со значительным участием ПМН-лейкоцитов; умеренно выраженное распространенное серозное, серозно-

геморрагическое и гнойно-геморрагическое пропитывание тканей; очаги некроза и гнойного расплавления или инкапсулирующиеся абсцессы, в т. ч. с признаками разрешения в отдельных случаях (не более, чем у 3 — 5 животных); гистологические признаки наличия свищного хода или язвы, в том числе в стадии заживления могут наблюдаться у единичных животных (1 — 3); при введении культуры исследуемого штамма в дозе 10^7 м. к. допустимо возникновение изменений, указанных выше.

9.2.2. Регионарные лимфатические узлы (паховые и подвздошные). Макроскопическая картина.

При введении культуры испытуемого штамма во всех указанных дозах допустимо: – незначительное или умеренное (до 0,5 см в диаметре) увеличение узлов, с гиперемией и уплотнением преимущественно в остром периоде, значительное (более 0,5 см) увеличение лимфатических узлов воспалительного характера с уплотнением, гиперемией, вовлечением окружающей клетчатки (периаденит) с умеренным воспалительным «отеком», без значительной геморрагической и гнойной инфильтрации, расплавления и некрозов – не более чем у половины опытных животных преимущественно в остром периоде процесса.

Гистологические изменения. При введении культуры исследуемого штамма во всех указанных дозах допустимы: острый серозный (негнойный) лимфаденит со слабо выраженным периаденитом без некротических изменений; подострый лимфаденит с участками грануляционной ткани, чисто продуктивными изменениями, частичным фиброзом, изредка с небольшими рассасывающимися гранулемами без очагов некроза и нагноения в половине случаев при введении культуры в дозах $2 \cdot 10^9$ и $1 \cdot 10^7$ м. к. и, в отдельных случаях (3—5), при дозе 10^2 м. к.

Кроме того, при введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. и иногда 10^7 м. к. допустимы острый очаговый серозно-гнойный и гнойный лимфаденит без значительных геморрагических проявлений, некрозов и гнойного расплавления у 30 % опытных животных; острый или подострый гнойный лимфаденит с небольшими единичными в срезе (1—3) очагами некроза, перифокальной реакцией, формированием гранулем, в т. ч. с «псевдоабсцессами»*, в отдельных случаях (3—5); при введении в

* Псевдоабсцессы – это скопление в период резорбции полиморфноядерных лейкоцитов в центральной части гранулем, формирующихся в процессе иммуногенеза. Морфологически эти участки могут напоминать микроабсцессы, но отличаются от последних своим генезом и исходом.

дозе в 10^2 м. к. очаговый серозный лимфаденит с единичными в срезе чисто продуктивными гранулемами в единичных случаях (1—2).

9.2.3. Контрлатеральные и отдаленные лимфатические узлы. Макроскопическая картина. При введении культуры во всех указанных дозах допустимо: умеренное или незначительное увеличение лимфатических узлов без признаков острых воспалительных изменений. Кроме того, при введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. возможно в отдельных (3—5) случаях уплотнение лимфатических узлов с проявлением умеренной гиперемии кожных покровов.

Гистологические изменения. При введении культуры во всех указанных дозах допустимы: гиперпластические изменения лимфоидных элементов разной степени выраженности; умеренно или незначительно выраженный очаговый серозный лимфаденит, небольшие участки продуктивных изменений и фиброза стромы узлов, при введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. у половины опытных животных при инокуляции культуры вакцинного штамма в других рекомендованных дозах, подобные изменения могут наблюдаться у 30 % животных.

9.2.4. Селезенка. Макроскопическая картина. При введении исследуемых культур 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, при введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. 30 % животных; признаки гиперплазии фолликулов (выбухание под капсулой).

Кроме того, при введении культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: у отдельных морских свинок (не более 6) возможно 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 30-м суткам; при введении исследуемой культуры в дозах 10^7 и 10^2 м. к. возможно у отдельных животных (1—2) развитие единичных узелков (1—3) без признаков некротизации, без абсцедирования слияния в более крупные очаги, без инкапсуляции и грубого рубцевания, полностью разрешающихся к 3-м суткам.

Гистологические изменения. При введении всех указанных доз допустимы: гиперплазия клеток белой пульпы (фолликулов и периартериальных муфт), плазмоклеточная реакция разной степени выраженности; полнокровие синусов селезенки; острый серозный (негнойный) очаго-

вый или диффузный спленит, в поздние сроки стихающий, лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме, небольшие участки грануляционной ткани чисто продуктивного характера, остаточные явления в виде небольших участков незначительного фиброза в строме и капсуле органа при введении культур в дозах $2 \cdot 10^9$ и 10^7 м. к. – у 50 % животных, при введении в дозе 10^2 м. к. – у отдельных (3—5) животных.

Кроме того, при введении исследуемой культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: гранулемы единичные (1—2) в срезе, преимущественно микроскопические, эпителиоидноклеточные без очагов некроза и явного абсцедирования, без грубого рубцевания по периферии, иногда с небольшим накоплением полиморфноядерных лейкоцитов («псевдоабсцесс») при процессах резорбции не более чем у 5—6 опытных животных; при введении исследуемой культуры в дозе 10^7 м. к. допустимы у единичных животных гранулемы (1—2) продуктивного характера, единичные в срезе, мелкие до субмилиарных.

9.2.5. Печень. Макроскопическая картина. При введении исследуемой культуры во всех указанных дозах допустимы: признаки умеренных диффузных дистрофических изменений органа (некоторое увеличение размеров, набухание, сероватый оттенок окраски); венозное полнокровие, иногда неравномерное; у единичных (1—2) опытных животных возможно развитие до 3 узелков в органе, преимущественно точечных без признаков некроза, нагноения и грубого рубцевания чисто продуктивного характера; беловатые или сероватые точечные и штрихообразные очаги, просвечивающие под капсулой, единичные (1—3) в органе у 1—3 животных.

Кроме того, при введении исследуемой культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: у отдельных животных (не более 6) немногочисленные (до 10) 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 10^7 м. к. у единичных (1—3) животных возможно развитие точечных и сублимационных узелков без признаков некротизации, без ассцедирования, без инкапсуляции и грубых рубцовых изменений ткани органа.

Гистологические изменения. При введении исследуемой культуры во всех указанных дозах у 50 % животных допустимы: умеренно выраженная зернистая, зернисто-вакуольная дистрофия, часто неравномерная; небольшие участки умеренной жировой дистрофии; мелкие, в пре-

делах 10—15 печеночных клеток лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме, единичные (2—3) в срезе.

При введении испытуемой культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: гранулемы эпителиоидно-клеточные без фокусов некроза, абсцедирования, инкапсуляции, выраженных рубцовых изменений, преимущественно микроскопических и субмилиарных размеров, изредка до милиарных, с признаками резорбции, не более чем у 6 животных; единичные (1—3) в срезах микроскопические очаги некроза и некробиоза в пределах 10—15 печеночных клеток при наличии хорошо выраженной продуктивной клеточной реакции без склонности к дальнейшей некротизации и абсцедирования у единичных животных (1—2); при введении исследуемой культуры в дозе 10^7 м. к. возможны единичные в срезе (1—2) гранулемы чисто продуктивного характера у единичных (1—2) животных; при введении исследуемой культуры в дозе 10^2 м. к. допустимы единичные (1—2) микроскопические продуктивные гранулемы единичные (1—2) в отдельных срезах у единичных (1—2) животных.

9.2.6. Легкие. Макроскопическая картина. При введении исследуемой культуры во всех дозах допустимы: участки неравномерного полнокровия легких; участки пониженной воздушности сероватосинюшного цвета.

При введении исследуемой культуры в дозе $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: милиарные и субмилиарные очаги уплотнения легочной ткани сероватозоватого, иногда синюшно-красного цвета, немногочисленные (до 10 в обоих легких) в половине случаев при отсутствии бактериологического выделения возбудителя чумы из ткани легких; при введении исследуемой культуры в дозах 10^7 и 10^2 м. к. возможно развитие единичных (1—3) милиарных и субмилиарных очагов уплотнения легочной ткани у единичных (1—3) опытных животных при отсутствии позитивных бактериологических данных.

Гистологические изменения. При введении всех указанных доз допустимы: признаки умеренной очаговой интерстициальной инфильтрации (преимущественно гиперпластического характера) 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 $2 \cdot 10^9$ м. к. допустимы: вышеописанные изменения преимущественно гиперпластического характера типа интерсти-

циальной 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 эталонного штамма EV.

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 подсчете 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 $2 \cdot 10^9$ м. к., при отсутствии других недопустимых изменений не может быть абсолютным показателем для ее отклонения.

9.3. Отсутствие или слабая выраженность дистрофических процессов в паренхиматозных органах, отсутствие роста испытуемого штамма чумного 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), 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—45 м суткам наблюдения, когда наступает полное восстановление структуры органов.

Формирование узелков в печени и селезенке может сочетаться с выраженными местными изменениями. Опыт показывает, что это наблюдается чаще. Однако в ряде случаев узелки обнаруживаются у морских свинок, у которых в месте введения культуры и регионарных лимфатических узлах изменения минимальные. Образование очагов некробиоза в печени, по-видимому, обусловлено токсигенными свойствами, которые сохраняют вакцинные штаммы чумного микроба и при введении в максимальной дозе эти свойства микробов иногда проявляются.

9.4. Недопустимо при подкожном введении даже при максимальной дозе ($2 \cdot 10^9$ м. к.) испытуемого вакцинного микроба 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 катаральной 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.

Все вышеизложенное позволяет считать, что изучение в динамике морфологических изменений в тканях и органах морских свинок, которым была введена испытуемая культура в максимальной дозе, дает возможность подойти к решению очень важных вопросов: о степени остаточной вирулентности и реактогенности культуры, полноценности взятых в опыт животных. Кроме того, при введении культуры вакцинного штамма в минимальной дозе может выявиться неоднородность клеточной популяции аттенуированного штамма.

10. Определение безвредности и реактогенности испытуемого штамма при аэрогенной иммунизации морских свинок

Аэрогенная вакцинация против чумы, особенно против легочной формы этой инфекции, является высокоэффективным методом, имеющим ряд преимуществ перед накожными, подкожным и внутрикожным путями введения вакцины. Методика определения безвредности вакцинного штамма чумного микроба при аэрогенной иммунизации морских свинок приведена в прилож. 4.

10.1. Определение приживаемости и распространяемости бактерий испытуемого и вакцинного штаммов чумного микроба.

Для вакцинного штамма чумного микроба при аэрогенном методе введения допустимо выделение чумного микроба: из легких у всех животных с 1-х до 14-х суток; из регионарных (бифуркационных) и других лимфатических узлов до 14-х суток; из печени и селезенки у единичных животных в течение 7 сут. Допустимо выделение единичных бактерий испытуемого вакцинного штамма чумного микроба в первые 1—3 сут из крови. Недопустимо выделение бактерий испытуемого штамма из органов и лимфатических узлов чаще и в более длительные сроки после введения, чем эталонного вакцинного штамма EV.

10.2. Определение реактогенности штамма для морских свинок при аэрогенном способе введения.

Реактогенность штамма при аэрогенном способе введения оценивают по изменению массы и температуры тела опытных животных.

Иммуногенный вакцинный штамм чумного микроба при аэрогенной иммунизации может вызывать снижение массы морских свинок, но не более чем на 5 % от первоначальной величины. К 7-м суткам масса животных должна восстанавливаться. Температура тела морских свинок в течение недели после иммунизации может повышаться. Среднее повышение температуры для группы животных, иммунизированных культурой испытуемого штамма, не должно существенно превышать наблюдаемое при иммунизации культурой эталонного вакцинного штамма (для групп животных в среднем увеличение температуры не должно превышать 1,5 °С).

10.3. Определение безвредности штамма по морфологическим показателям при аэрогенном способе введения.

При ингаляционном способе введения испытуемого штамма микробы попадают в верхние дыхательные пути и в легкие, поэтому мор-

фологические изменения раньше развиваются в легких, чем в других внутренних органах. При ингаляционной иммунизации живыми чумными микробами при гистологическом исследовании в легких наблюдается развитие продуктивной межуточной реакции в межальвеолярных перегородках, гиперпластических процессов в перибронхиальных, периваскулярных лимфоидных образованиях, сочетающихся с увеличением в клеточных элементах количества РНК.

10.3.1. Допустимые изменения.

В легких допустимы межуточная продуктивная реакция, при которой имеется инфильтрация межальвеолярных перегородок гистиоцитами, лимфоцитами, эпителиоидными клетками и макрофагами без резкого сдавления просветов альвеол, наличие в легких эпителиоидноклеточных гранулем (не более 10—15 в обоих легких).

В регионарных лимфатических узлах допустимы гиперпластические процессы различной степени выраженности, образование эпителиоидноклеточных гранулем (до 6), трансформация единичных гранулем в псевдоабсцессы без выраженных явлений некроза в них. В селезенке – гиперпластические процессы и образование эпителиоидноклеточных гранулем (не более 10), большая часть которых не должна превращаться в псевдоабсцессы. В печени допустимы умеренно выраженные дистрофические изменения паренхиматозных элементов, диффузная или мелкоочаговая пролиферация купферовских клеток и образование эпителиоидноклеточных гранулем (до 10), превращение в псевдоабсцессы лишь некоторых гранулем.

Почки, надпочечники, сердце – допустимы умеренные дистрофические изменения паренхиматозных элементов этих органов.

10.3.2. Недопустимые изменения. Недопустимы в легких диффузная или крупноочаговая межуточная реакция с резким сдавлением просветов альвеол клеточными инфильтратами, наличие больших количеств нейтрофильных лейкоцитов среди клеток межальвеолярных перегородок; множественные, хотя бы и мелкие очаги (в 5 и более альвеол) катарально-десквамативной пневмонии; образование более 10 гранулем и превращение их в псевдоабсцессы, катарально-геморрагические пневмонии, гнойные трахеиты и бронхиты, абсцессы, множественные очаговые или сливные кровоизлияния, распространенные перибронхиальные и периваскулярные склерозы.

В регионарных лимфатических узлах недопустимо развитие гнойного аденита и периаденита; наличие массивных кровоизлияний, артериолонекрозов, образование более 5 гранулем с преимущественной их

трансформацией в псевдоабсцессы и с выраженными явлениями некроза. В селезенке недопустимо образование более 10 гранулем и превращение их в псевдоабсцессы, гнойные спленииты, абсцессы, очаги некроза, обширные кровоизлияния. В печени недопустимы резко выраженные дистрофические изменения, доходящие до образования крупных (более 10 клеток) фокусов некроза, абсцессы, гнойные гепатиты, массивные кровоизлияния, большое количество гранулем (более 10) и их превращение в псевдоабсцессы.

11. Оценка реактогенности испытуемого штамма по стрессорному действию

Стрессорное действие культуры вакцинного штамма оценивают по уровню в периферической крови кортикостероидных гормонов и их фракций, методика определения которых описана в прилож. 5.

Вакцинный штамм чумного микроба EV, введенный в дозе 10^7 м. к. через 1 сут. после введения обычно обуславливает у морских свинок повышение общих 11-ОКС в 2 раза, свободных – в 2,3—2,5 раза, белковосвязанных – 1,7—2,0 раза. Коэфициент отношения биологически активных фракций к белковосвязанным не превышает 1. Испытуемый штамм, предлагаемый в качестве вакцинного, не должен по стрессорному действию вызывать более выраженное действие, чем контрольный эталонный штамм чумного микроба EV.

12. Определение влияния испытуемого 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 иммуногенной реактивности организма на другие неродственные антигены, лежать в основе неполноценного специфического ответа на сам штамм. Методы определения действия вакцинного штамма на иммунную систему приведены в прилож. 6.

12.1. Испытуемый штамм чумного микроба в дозе $1 \cdot 10^5$ м. к. при подкожном введении морским свинкам не должен оказывать повреждающее действие на иммунную систему: должен вызывать умеренное повышение (в 1,5—2,0 раза) количества лимфоцитов, находящихся в $S+G_2+M$ фазах

клеточного цикла, статистически не отличающиеся от показателя наблюдаемого для вакцинного штамма EV.

12.2. Введение в макроорганизм митогена или антигена индуцирует пролиферацию лимфоцитов, т. е. деление этих клеток. Предполагается прямая зависимость между степенью выраженности специфической трансформации лимфоцитов в условиях *in vitro* (показатель РБТЛ) и проявлением специфического клеточного иммунного ответа на данный антиген. Индекс стимуляции реакции бласттрансформации лимфоцитов (ИС РБТЛ) для испытуемого штамма должен быть в 1,5—3 раза выше с лимфоцитами морских свинок, иммунизированных $1 \cdot 10^5$ м. к., чем для интактных лимфоцитов под воздействием неспецифических митогенов и ультразвуковых дезинтегрантов (УЗД) чумного микроба. Уровень стимуляции РБТЛ для испытуемого штамма не должен быть статистически значимо ниже ИС РБТЛ для вакцинного штамма EV.

12.3. Цитотоксический индекс (ЦТИ) у морских свинок, привитых подкожно $1 \cdot 10^5$ м. к. испытуемого штамма, не должен быть ниже показателя ЦТИ, чем у привитых эталонным вакцинным штаммом EV.

12.4. Макрофаги морских свинок, привитых подкожно $1 \cdot 10^5$ м. к. испытуемого штамма, не должны иметь более низкие показатели процента фагоцитирующих клеток (ПФ) и фагоцитарного числа (ФЧ), определяемого количеством фагоцитированных микробов на один фагоцит, а также абсолютного фагоцитарного показателя (АФП), чем у привитых этой же дозой эталонного вакцинного штамма EV.

12.5. Испытуемый вакцинный штамм чумного микроба в дозе $1 \cdot 10^5$ м. к. не должен подавлять развитие клеточного (по реакции гиперчувствительности замедленного типа) и гуморального (по числу антителообразующих клеток к эритроцитам барана) иммунного статуса у белых мышей на гетерологичные антигены. Допускается минимальное снижение иммунного ответа, но не большее чем при введении в этой дозе эталонного вакцинного штамма EV. Методика определения приведена в п. 7 прилож. 6.

13. Иммуногенная активность штамма

Вакцинный штамм чумного микроба должен предохранять морских свинок от подкожного и аэрогенного заражения, а белых мышей от подкожного заражения вирулентной культурой чумного микроба и индуцировать формирование у животных иммунитета достаточной напря-

женности и длительности. Методики определения иммуногенной активности вакцинного штамма приведены в прилож. 7.

13.1. Величина $ЕД_{50}$, рассчитанная для контрольного и исследуемого штаммов не должна превышать для морских свинок $1 \cdot 10^3$, для белых мышей $1 \cdot 10^4$ м. к. По протективной эффективности испытуемый штамм считают равноценным контрольному вакцинному, если его минимальный показатель $ЕД_{50}$ не более максимального показателя эталонного вакцинного штамма EV. Испытуемый штамм можно считать более иммуногенным, если его максимальный показатель $ЕД_{50}$ меньше минимального показателя $ЕД_{50}$ контрольного штамма.

13.2. Минимальная иммунизирующая доза соответствует наименьшему количеству микробов, способных индуцировать формирование специфического иммунитета, обеспечивающего выживание не менее чем 80 % животных, вакцинированных этой дозой и зараженных на 21-е сутки 200 DCL (*Dosis certae letalis*) вирулентного штамма чумного микроба.

Минимальная иммунизирующая доза штамма EV линии НИИЭГ и испытуемого штамма для морских свинок не должна превышать $5 \cdot 10^3$ м. к. двухсуточной агаровой культуры.

13.3. Вакцинный штамм при иммунизации морских свинок в дозе $5 \cdot 10^3$ м. к. и подкожном заражении культурой вирулентного штамма чумного микроба в дозе 200 DCL уже на 7-ой день после прививки должен предохранять от гибели не менее 50 % привитых животных.

13.4. Напряженность иммунитета определяется по способности вакцинного штамма предохранять животное от гибели после заражения массивной дозой вирулентной культуры *Y. pestis*. Напряженность иммунитета выражается числом микробных клеток, при заражении которыми на 21-е сутки погибает (LD_{50}) 50 % морских свинок, иммунизированных $5 \cdot 10^3$ м. к. и белых мышей, иммунизированных 10^4 м. к., а также индексом иммунитета.

Индекс иммунитета – отношение величины LD_{50} в м. к., рассчитанной для вакцинированных животных к аналогичному показателю, рассчитанному для интактных животных.

Напряженность иммунитета, создаваемого культурой испытуемого вакцинного штамма, не должна быть меньше аналогичного показателя, полученного на животных, вакцинированных культурой вакцинного штамма EV, то есть величины LD_{50} и индекса иммунитета, рассчитанные для испытуемого штамма, не должны быть ниже, чем аналогичные показатели, рассчитанные для контрольного эталонного штамма. При

сравнении вышеуказанных показателей, расчитанных для контрольного штамма EV и для исследуемого вакцинного штамма, учитывается только статистически достоверная разница.

13.5. Испытуемый штамм чумного микроба, введенный в дозе $5 \cdot 10^3$ м. к., должен вызывать у морских свинок иммунитет, по длительности не уступающий иммунитету, создаваемому той же дозой вакцинного штамма EV.

13.6. Эталонный вакцинный и испытуемый штаммы должны защищать от чумы не менее 8 из 10 морских свинок иммунизированных аэрогенно $2—8 \cdot 10^6$ колониеобразующих клеток.

14. Испытания стабильности штамма в производственных условиях

Испытуемый штамм, удовлетворяющий по результатам доклинических испытаний требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам чумного микроба, следует проверить на стабильность свойств в производственных условиях.

Вакцинные штаммы чумного микроба не должны изменять свои культурально-морфологические, биохимические и иммуногенные свойства при испытании на стабильность путем двукратного выращивания при аэрации в бульоне; должны давать в производственных условиях изготовления вакцины хорошую урожайность, жизнеспособность, стабильность суспензии, высокую активность готового препарата живой сухой вакцины.

Контроль трех первых серий вакцины чумной живой сухой, приготовленной из нового штамма, должен проводиться в соответствии с нормативной документацией на готовый препарат вакцины чумной живой сухой и удовлетворять требованиям нормативной документации, определяющим ее качество.

15. Испытания вакцины чумной сухой на людях

Разрешение на апробацию лабораторных серий экспериментальной вакцины из нового штамма на реактогенность, безопасность и специфическую активность на ограниченной группе людей дает Министерство здравохранения Российской Федерации по представлению Комитета МИБП. Для возбуждения ходатайства об испытании вакцины на добровольцах необходимо:

15.1. Обсудить на Ученом совете НИИ отчет о доклинических лабораторных испытаниях, результаты контроля в соответствии с фармакопейной статьей трех экспериментальных серий вакцины чумной живой сухой из нового штамма, проект программы ограниченных испытаний;

15.2. Представить в Комитет МИБП ходатайство о разрешении испытаний на добровольцах экспериментальной вакцины из нового штамма, акт государственной комиссии о лабораторных доклинических испытаниях этого штамма, результаты контроля ОБТК трех первых серий вакцины в соответствии с ФС на коммерческую вакцину, решение Ученого Совета НИИ, результаты авторских лабораторных испытаний; в ГИСК им. Л. А. Тарасевича – трех первых экспериментальных серий препарата;

15.3. ГИСК им. Л. А. Тарасевича направляет в Комитет МИБП решение Ученого Совета о целесообразности испытания на добровольцах вакцины из нового штамма, заключение о качестве трех экспериментальных серий;

15.4. Комитет МИБП рассматривает все материалы о новом вакцинном штамме чумного микроба (результаты авторских испытаний, заключение государственной комиссии, заключение ГИСК им. Л. А. Тарасевича, программу испытаний) и направляет свою рекомендацию в Министерство здравоохранения РФ.

15.5. Испытуемый штамм чумного микроба, удовлетворяющий всем перечисленным требованиям, прошедший с положительным заключением государственные испытания, может признан как вакцинный, утвержден Министерством здравоохранения РФ.

15.6. Дальнейшая апробация вакцины из нового штамма на людях проводится в общем порядке, установленным Министерством здравоохранеия РФ для внедрения новых бактерийных и вирусных препаратов санитарными правилами «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов» (СП 3.3.2.561—96).

Приложение 1
(обязательное)

Методики идентификации штаммов чумного микроба по видовым признакам

1. Определение чувствительности штамма к чумному диагностическому бактериофагу Л-413С

Суточную культуру испытуемого штамма засевают «газоном» на поверхность агара в чашке Петри и наносят «дорожкой» каплю диагностического чумного бактериофага Л-413С. Посев инкубируют при температуре (28 ± 1) °С. Учет результатов проводят через 24—48 ч. На чашках с чувствительными к фагу культурами *Y. pestis* образуются характерные зоны лизиса.

Исследуемый вакцинный штамм чумного микроба должен лизироваться бактериофагом чумным Л-413 С.

2. Способность бактерий ферментировать сахара и спирты

Определяют на средах Гисса по общепринятой методике или с использованием специальных тест-систем импортного или отечественного производства в соответствии с Инструкциями по их применению.

3. Определение продукции капсульного антигена FI

Проводят путем постановки реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). В 8 лунок полистироловой пластины вносят по 0,4 мл раствора твина-80 в разведении 1 : 50 000 или другого стабилизатора (нормальную кроличью или лошадиную сыворотку в разведении 1 : 100). В первую лунку добавляют 0,4 мл культуры чумного микроба, выращенной на обогащенной питательной среде при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч и инактивированной формалином, в концентрации $1 \cdot 10^6$ м. к. в 1 мл, делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,4 мл из одной лунки в другую до 7-ой лунки включительно, из которой 0,4 мл удаляют. 8-я лунка используется для контроля диагностикума. Затем во все лунки добавляют по одной капле (0,05 мл) диагностикума эритроцитарного чумного иммуноглобулинового 2,5 %-ой концентрации. Содержимое лунок перемешивают покачиванием пластины; пластину оставляют на 18—24 ч при температуре (22 ± 4) °С, после чего учитывают результат. Результат считают положительным,

когда эритроциты выпадают на дно лунок равномерным слоем, занимая не менее 2/3 сферической поверхности, иногда отмечается фестончатое оплывание края агглютината. В случае отрицательного результата РНГА эритроциты выпадают на дно лунок в виде «пуговки» или узкого колечка с ровным краем как в контроле. При оценке чувствительности РНГА концентрацию культуры чумного микроба в 1-ой лунке принимают равной $5 \cdot 10^5$ м. к. в 1 мл.

4. Определение популяционного состава культуры исследуемого вакцинного штамма *Y. pestis* по признаку кальцийзависимости

4.1. Методика приготовления магний-оксалатного агара

Необходимо заранее приготовить следующие компоненты и маточные растворы: 2 %-ный питательный агар на основе ферментативного гидролизата мяса (аминного азота – 110 ± 10 мг %, натрия хлористого – 5,0 г/л калия хлористого – 0,2 г/л). Натрий фосфорно-кислый двузамещенный в среду не добавлять, т. к. фосфаты частично связывают, а затем отдают ионы кальция. pH среды до 7,0—7,2 в этом случае доводят раствором едкого натра. Готовая питательная среда стерилизуется автоклавированием при температуре 120—125 °С 30 мин.

Для приготовления 0,25 М раствора оксалата (щавелево-кислого) натрия – $Na_2C_2O_4$, нужно 33,6 г соли растворить в дистиллированной воде и довести объем раствора до 1 л. Для приготовления 0,5 М раствора хлористого магния – $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, требуется 101,66 г данной соли на 1 л дистиллированной воды. Растворы оксалата натрия и хлористого магния разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 125 °С 30 мин. Сульфит натрия – Na_2SO_3, 1 %-ный спиртовый раствор генцианвиолета или метилового фиолетового не стерилизуется. Указанные растворы могут длительное время храниться при температуре 18—25 °С.

Перед разогревом питательного агара в автоклаве текучим паром в него добавляют 80 мл/л 0,25 М раствора оксалата натрия для связывания имеющегося в питательной среде кальция. Затем уже в растопленный агар вводят 40 мл/л 0,5 М раствора хлористого магния. 0,5 г/л сульфита натрия (навеску сульфита натрия *ex tempore* растворяют в дистиллированной воде и кипятят 10 мин на электрической плитке) и 1 мл 1 %-ного спиртового раствора генцианвиолета. Агаровую среду с добавками тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки

Петри. Исследуемый материал высевают на подсушенный агар и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 72 ч. Контрольной средой в этом случае является питательный агар с кальцием (см. ниже).

Для получения достоверных результатов рекомендуется использовать чашки с дифференциальной и контрольной питательными средами, разлитыми в день проведения работы или накануне.

4.2. Приготовление агара с добавлением ионов кальция

Питательный агар с кальцием готовят на ферментативном гидролизате мяса.

Он содержит:

- аминного азота – 110 ± 10 мг %;
- агар-агар – 30,0 г/л;
- натрия хлористого – 5,0 г/л;
- калия хлористого –0,2 г/л;
- натрия фосфорно-кислого двузамещенного – 1,02 г/л;
- pH среды – 7,0—7,2.

Разливают питательную среду в зависимости от потребностей: во флаконы, колбы, матрацы или бутыли. Стерилизуют автоклавированием при температуре 120—126 °С в течение 30 мин. Стерильная питательная среда хранится при температуре 18—25 °С в течение 10 сут., при 4—6 °С – 30 сут.

Перед розливом в чашки Петри питательный агар растапливают на водяной бане или в автоклаве текучим паром. В растопленный агар добавляют 0,5 г/л сульфита натрия, 1 мл/л 1 %-ного спиртового раствора генцианвиолета или метилового фиолетового, 4—8 мл/л 250 мМ раствора $CaCl_2$. Для приготовления маточного раствора хлористого кальция указанной концентрации навеска соли в случае использования безводного препарата (мол. масса 111,0) составляет 27,75 г/л, а в случае гидрата $CaCl_2 \cdot 6H_20$ (мол. масса 219,09) – 54,77 г/л. Раствор хлористого кальция стерилизуют автоклавированием при температуре 125 °С 30 мин. Хранится при комнатной температуре 30 сут. Спиртовый раствор генцианвиолета не стерилизуют, он хранится под пробкой длительное время. Раствор сульфита натрия готовят перед приготовлением чашек, растворяя 500 мг соли в 10 мл воды; стерилизуют кипячением.

4.3. Методика определения доли кальцийнезависимых (Cad^-) клеток в популяции микробных культур чумного микроба

Для определения доли кальций независимых (Cad^-) клеток в популяции микробных культур чумного микроба используют двухсуточные агаровые культуры, выращенные при температуре (28 ± 1) °С. Из полученной культуры готовят взвесь в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42—28—59—86П) 10 единиц, содержащую в 1 мл $1 \cdot 10^9$ микробных клеток.

Высев культуры чумного микроба на чашки с магний-оксалатным питательны агаром производят по 0,1 мл из разведений 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5} исходной бактериальной взвеси, содержащей $1 \cdot 10^9$ м. к./мл, на агаровые пластинки с ионами кальция по 0,1 мл из разведений 10^{-5} и 10^{-6}. Каждое разведение следует высевать на 3 (или более) чашки с питательным агаром. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 3 сут. По истечении срока инкубирования производят подсчет колоний. На магний-оксалатном питательном агаре вырастают колонии трех типов: крупные (2—2,5 мм), средние (1,5—2 мм) и очень мелкие (менее 1 мм). Крупные и средние колонии формируют клетки, утратившие кальцийзависимость (кальций независимые мутанты), мелкие состоят из бактерий, отличающихся от типичных клеток по степени зависимости от кальция, способности синтезировать VW и другие антигены, по стабильности этих признаков и т. д. Подсчитывают только крупные и средние колонии. На агаре с кальцием формируются только крупные колонии (2,5—3 мм) с типичной морфологией, все выросшие колонии подсчитывают.

Доля кальций независимых микробных клеток в популяции исследуемой культуры выражается в процентах и определяется как отношение количества кальций независимых мутантов, содержащихся в исходной суспензии, к общему числу колониеобразующих бактерий в этой суспензии. Расчет производится по следующей формуле:

$$X = \frac{nCad^-}{N} \cdot 100\ \%, \quad \text{где}$$

X – процент кальций независимых микробных клеток в популяции;

nCad– – количество кальций независимых колоний, выросших на магнийоксалатном питательном агаре при температуре 37 °С в течение 3 сут.; *N* – количество колоний, выросших на агаре с кальцием.

Доля кальцийнезависимых мутантов в популяции культур чумного микроба, недавно пропассированных через организм лабораторных животных и не подвергавшихся длительному хранению или каким-либо физическим воздействиям, не должна превышать 0,3 %.

5. Определение пестициногенности, фибринолитической и плазмокоагулазной активностей

5.1. Определение пестициногенности

Для определения свойства пестициногенности культуру испытуемого штамма засевают петлей на чашки с агаром Хоттингера точками на расстоянии 2—3 см. В качестве положительного контроля используют эталонный вакцинный штамм чумного микроба EV, обладающий свойством пестициногенности. Посевы инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 2 сут., затем культуры в течение 10 мин убивают парами хлороформа, после чего хорошо проветривают чашки (в течение 10 мин). На поверхность агаровой пластинки наслаивают 4,5 мл расплавленного и остуженного до температуры 50 °С 0,8 %-ного питательного агара, в который предварительно было внесено 0,5 мл суточной бульонной культуры индикаторного штамма (например, *Y. pestis* 1146 или *Y. pseudotuberculosis* 847). Посевы инкубируют при температуре (37 ±1) °С. Учет результатов проводят через 24 и 48 ч. Культуры, продуцирующие пестицин, образуют четкие зоны подавления роста индикаторного штамма.

5.2. Определение фибринолитической и плазмокоагулазной активностей

При изучении фибринолитической активности нативную человеческую плазму или цитратную кроличью разводят 0,9 %-ным раствором хлорида натрия 1 : 8 или 1 : 10 и разливают по 0,5 мл в каждую пробирку. Готовят взвеси бактерий двухсуточных агаровых культур испытуемого и контрольного штаммов в концентрации $1 \cdot 10^9$ м. к./мл. По 0,25 мл взвеси исследуемого материала вносят в пробирку с плазмой, перемешивают и добавляют 0,25 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия и 0,1 мл 0,5 %-ного раствора хлорида кальция. В другую пробирку с 0,5 мл плазмы вносят 0,25 мл приготовленной взвеси культуры *Y. pestis*

EV и 0,1 мл 0,5 %-ного раствора хлорида кальция (положительный контроль). В третью пробирку, содержащую 0,5 мл нативной плазмы, вносят 0,25 мл приготовленной суспензии исследуемого вакцинного штамма и 0,1 мл 0,5 %-ного раствора хлорида кальция. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Через 40—60 мин проверяют образование сгустка. Если за 60 мин сгусток не образовался, пробу следует повторить. В случае образования сгустка пробирки оставляют в термостате еще на 18—20 ч. Результаты оценивают следующим образом: «4+» – полное растворение сгустка; «3+» – почти полное растворение сгустка, на поверхности очень маленькая пленка; «2+» – небольшой сгусток плавает в большом количестве плазмы; «+» – хорошо сформированный сгусток в небольшом количестве плазмы; «-» – сгусток заполняет всю пробирку (лизиса не произошло).

Испытуемый штамм должен растворять сгусток плазмы с интенсивностью, не уступающей контрольному вакцинному штамму EV – и не менее чем на «3+».

6. Определение признака пигментсорбции

Методика приготовления синтетической питательной среды с гемином.

Синтетическая питательная среда с гемином предложена Tacrson и Burrows для дифференциации Pgm^+ – Pgm^- клеток чумного микроба. Она включает около 20 компонентов. В соответствии с методикой, питательную среду готовят, смешивая в определенной пропорции три ее составляющие, которые готовят, стерилизуют и хранят раздельно: агаровая основа, питательная основа, специальные добавки. Перечень компонентов, входящих в каждую из них, приведен в табл. 1.

Таблица 1

Состав среды с гемином

№№ п/п	Компоненты среды	Содержание (г/л)
1	Агаровая основа – агар-агар	20,0
Компоненты буферного раствора		
2	KH_2PO_4	5,0
3	NaOH (1 н раствор)	до pH 8,0
Питательная основа		
4	DL-фенилаланин	1,2
5	DL-метионин	0,6
6	DL-валин	0,5
7	DL-изолейцин	0,55
8	L-цистеин	0,5
9	L -глицин	0,5
10	DL-аргинин	1,0
11	D-галактоза	20,0
12	NH_4Cl	5,3
13	$(NH_4)_2SO_4$	5,3
14	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0
15	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 % раствор)	10 мл
16	$Mn(CH_3COO)_3$ (0,01 % раствор)	10 мл
17	Молочная кислота (4 % раствор)	10 мл
18	Пантеонат кальция (0,1 % раствор)	2,5 мл
19	Биотин (раствор 1,25 мг/л)	10,0 мл
Специальные добавки		
20	Гемин	0,2
21	Сульфит натрия	0,5
22	Мясотриптический бульон (100 = 10 мг % аминного азота)	3—5 мл

Далее дана методика приготовления каждой из трех перечисленных составных частей в отдельности и питательной среды с гемином в целом.

6.1. Приготовление агаровой основы: навеску сухого агар-агара (10 г) помещают в матрац, заливают 500 мл фосфатного буферного раствора и оставляют на ночь для набухания. Агар-агар должен быть полностью погружен в буферный раствор. Матрац закрывают ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком. На другой день среду стерилизуют автоклавированием при температуре 125 °С в течение 30 мин.

6.2. Состав буферного раствора: навеску соли KH_2PO_4 (5 г/л) растворяют в дистиллированной воде и доводят pH до 8,0 добавлением 1 н раствора NaOH.

6.3. Приготовление питательной основы: в 1 л дистиллированной воды растворяют указанные в табл. 1 количества компонентов питательной основы. Для полного растворения добавок необходимо выдержать раствор при температуре (6—8) °С в течение 18 ч. Затем раствор стерилизуют путем фильтрации через бактериальные свечи или мембранные фильтры в стерильную колбу Бунзена или бутыль соответствующей емкости. Стерильную среду разливают во флаконы по 50 мл и хранят при температуре (6—8) °С. В этих условиях стерильная питательная основа может храниться до 1 г. и более, не утрачивая своих свойств.

6.4. Специальные добавки добавляются в агаровую основу вместе с питательной основой непосредственно перед розливом чашек.

Раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) готовят *ex tempore* на стерильной дистиллированной воде. Стерилизуют кипячением в течение 10 мин на спиртовке или плитке. Навеску сульфита натрия (500 мг) растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Навеску гемина (200 мг) растворяют перед добавлением в агар в 1 мл 1,0 н NaOH, разбавленного 5 мл стерильного 0,9 %-ного раствора хлорида натрия. Стерилизации этот раствор не подвергают.

Мясотриптический бульон – стерильная питательная среда, содержащая (120 ± 10) мг % аминного азота и приготовленная по стандартной прописи. Добавляется 3—5 мл бульона на 1 л питательного агара для обеспечения роста чумных микробов, нуждающихся в дополнительных питательных веществах.

6.5. Приготовление дифференциально-диагностической геминовой среды: к 1 л стерильной, растопленной в автоклаве текучим паром агаровой основы добавляют 100 мл стерильной питательной основы, 10 мл

раствора гемина, 10 мл прокипяченного 5 % раствора сульфита натрия и 3—5 мл стерильного мясотриптического бульона. Питательный агар с добавками тщательно перемешивают и разливают по 30 мл в чашки Петри. Толщина слоя должна быть несколько больше, чем при розливе обычного питательного агара, т. к. посевы на агаре с гемином инкубируют более продолжительное время. Из культуры чумного микроба, выращенной на мясотриптическом питательном агаре при температуре (26—28) °С в течение 2 сут готовят взвесь в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия, содержащую $1 \cdot 10^9$ м. к./мл по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича, делают последовательные десятикратные разведения и из разведений 10^{-4}, 10^{-5} и 10^{-6} высевают по 0,1 мл на подсушенные чашки с геминовой средой. Посевы инкубируют при температуре (26—28) °С, просматривая чашки через 5—7 и более суток. Предварительные выводы о наличии или отсутствии у изучаемых культур Pgm^+ – признака могут быть сделаны на 5—7-е сутки при обязательном сравнении с положительным и отрицательным контролями.

7. Определение плазмидного состава штаммов *Y. pestis*

Двухсуточную агаровую культуру испытуемого и контрольного штаммов суспендируют в 100 мкл литической смеси (50 мМ Tris, 3 % SDS, pH доводят до 12,6 прибавлением 2 н NaOH), добавляют 10 мкл лизоцима (10 мкг/мл TES); прогревают 30 мин на водяной бане при температуре 50—60 °С; добавляют 100 мкл смеси фенол-хлороформ (1 : 1), быстро встряхивают и центрифугируют 15 мин при 4000 × g. Отбирают верхнюю фазу, не задевая интерфазы и осадка, добавляют лидирующий краситель (бромфеноловый синий) и наносят на гель. Электрофорез проводят в ТАЕ-буфере, pH 7,8—7,9 при 12 в/см^2 в течение 1—2 ч. Затем окрашенный бромистым этидием гель просматривают в УФ-свете. На электрофореграмме препарата ДНК из культуры эталонного вакцинного штамма выявляется 3 полосы плазмидной ДНК, соответствующих по электрофоретической подвижности ДНК с молекулярной массой ≈ 60 MD (pFra), ≈ 45 MD (pCad) и ≈ 6 MD (pPst).

Таблица 2

Характеристика основных свойств эталонного вакцинного штамма чумного микроба EV

№№ п/п	Признак	Наличие признака
1	Морфология – биполярные палочки	+
2	Подвижность	–
3	Окраска по Граму - грамнегативные	+
4	Рост на обычных питательных средах в R-форме	+
5	Чувствительность к чумному диагностическому фагу	+
6	Ферментация мочевины	–
7	Ферментация глюкозы	+
8	Ферментация рамнозы	– (+)
9	Ферментация лактозы	–
10	Ферментация глицерина	– (+)
11	Продукция антигена FI	+
12	Зависимость от ионов Ca^{2+} при 37 °С	+
13	Пестицин-фибринолизин-плазмокоагулазная активность	+
14	Наличие плазмид pFra, pCad, pPst	+
15	Способность к пигментсорбции (Pgm)	–
16	Вирулентность для лабораторных животных	–

Приложение 2
(обязательное)

Определение степени остаточной вирулентности (безвредности) исследуемого штамма по распространяемости и приживаемости в органах и тканях при подкожном способе введения морским свинкам

Оценку безвредности исследуемого штамма чумного микроба проводят на морских свинках.

Распространяемость, приживаемость, безвредность и реактогенность культур, исследуемых штаммов определяют в одном опыте на одной и той же группе животных.

1. Перед началом опыта проводят оценку поголовья животных в виварии путем их выборочного взвешивания, термометрирования и ежедневного клинического наблюдения. Состояние здоровья поголовья морских свинок в виварии определяют также по данным патологоанатомического и гистологического исследований. Для этого по 10 животных вскрывают и исследуют в три этапа: в начале обсервации, в день начала опыта и через 30 сут после постановки опыта. Морские свинки могут быть использованы в эксперименте только в том случае, если большинство животных вивария клинически здоровые, за время наблюдения не снизили или прибавили в массе, ректальная температура не превысила 38,5 °С. При общем благополучном состоянии поголовья могут наблюдаться отдельные случаи заболевания и даже гибели животных, потеря отдельными животными в массе. Эти случаи не должны превышать 1,5 % от общего числа животных вивария. Убедившись по перечисленным выше данным в том, что поголовье отвечает указанным требованиям, из его числа набирают для опытов морских свинок с массой 250—350 г.

Поступивших в лабораторию морских свинок взвешивают и выдерживают под наблюдением не менее 10 сут. Повторное взвешивание и термометрирование морских свинок проводят накануне введения им культур исследуемых штаммов. Перед опытом животных с учетом показателей массы распределяют на равнозначные группы для каждого штамма и каждой дозы.

2. На каждый штамм берут по 150 морских свинок – 5 равнозначных групп по 30 животных в каждой. В опыте используют двухсуточные агаровые культуры испытуемого и эталонного штаммов чумного

микроба, выращенных при температуре 26—28 °С, которые вводят подкожно в дозах 10^2, $5 \cdot 10^2$, 10^7, $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. по ОСО мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42—28—59—85П). Каждую дозу вводят 30 морским свинкам.

3. Для определения распространяемости, приживаемости микробов в органах и тканях, характера патоморфологических изменений, возникающих после введения культур, животных по 3 на каждую дозу умерщвляют поочередно хлороформом на 1, 3, 5, 7, 10, 14, 30 и 45-е сутки после введения испытуемых культур. Сразу после эфтаназии (не позднее 20—30 мин после смерти) проводят их вскрытие, тщательное описание видимых патологоанатомических изменений и бактериологическое исследование внутренних органов, а также забирают органы для патогистологического исследования.

4. Вскрытие производят общепринятым методом. Кусочки органов, тканей и лимфатические узлы фиксируют в 10 %-ном растворе нейтрального формалина. Для каждого животного берут отдельную банку емкостью 300—500 мл с притертой или резиновой пробкой, на 2/3 заполненную формалином. В банку помещают бумажную этикетку, на которой графитовым карандашом четко крупно написаны с обеих сторон: номер животного, шифр испытуемой культуры, дата взятия материала и день наблюдения. На другой этикетке пишут названия лимфатических узлов, соответствующие лимфатические узлы при вскрытии животных помещают на нее против этих названий. Результаты патологоанатомического исследования записывают в протокол вскрытия (см. в конце приложения).

При вскрытии 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, 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 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 после легкого подсушивания тоже 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 развитие интерстициальной реакции в легких (макроскопически она может определяться в виде мелких серовато-розовых очажков или тяжей, расположенных по ходу главным образом сосудов и бронхов), а также на наличие узелков, очагов некроза в печени и селезенке, отмечая особо их количество, размеры и внешний вид. Увеличение селезенки лучше регистрировать указанием ее размеров (длины, ширины, толщины). Кусочки органов берут обязательно 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, надрезают ее и помещают в раствор формалина. Кроме этого, для исследования берут надпочечник и подвздошные лимфатические узлы. Отмечают размеры, консистенцию, цвет лимфатических узлов и состояние окружающей клетчатки. Наконец, выделяют мезентериальные лимфатические узлы, расположенные ближе к корню брыжейки. 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 оставляют в формалине на 14 сут при температуре 18—25 °С, после чего его подвергают дальнейшему гистологическому исследованию.

5. Во время вскрытия проводят и бактериологическое исследование. Высевы из органов и тканей проводят на питательный агар Хоттингера pH 7,2 с сульфитом натрия (0,025 % по отношению к объему агара), на питательный агар с добавлением 5 % дефибринированной крови и агар Эндо. На агар Хоттингера делают высев из места введения культуры, правого подвздошного лимфатического узла, костного мозга (первая чашка), из лимфатических узлов - правого (регионарного) и левого пахового, правого и левого подмышечного (вторая чашка), из печени и селезенки (третья чашка), из легких и сердца (четвертая чашка). На кровяной агар 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 петлей из бедренной кости, посев крови производят мазком-отпечатком отсеченной верхушкой сердца. Чашки Петри с высевами из органов на питательный агар Хоттингера помещают в термостат при температуре 26—28 °С, на кровяной агар и

агар Эндо при температуре (37 ± 1) °С на 5 сут. Просматривают посевы через 2 сут. и окончательно через 5 сут. инкубирования. 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.

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

1) Культура чумного 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 чумного 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 вакцинного штамма из органов подопытных животных выделить не удалось, но на агаровых пластинках 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.

Протокол вскрытия

от _____ 20_____ г.

№ животного _____вид _____ пол_____ масса_____

Название культуры_____ доза_____ срок наблюдения _____

Метод и место введения _____

Дата заражения_____ падежа_____ умерщвления _____

Результаты вскрытия

Упитанность _____

Состояние подкожных сосудов _____

Место введения _____

Лимфатические узлы _____

Правый пахов. _____

Левый пахов. _____

Правый подмыш. _____

Подвздошные _____

Паратрахеальные _____

Бифуркационные* _____

Легкие _____

Селезенка _____

Печень _____

Почки _____

Надпочечники _____

Др. органы _____

Костный мозг _____

Вскрывал _____

* Берутся для гистологии при аэрогенном введении

6. Методика определения реактогенности вакцинного штамма для морских свинок

Реактогенность штамма для морских свинок определяют по характеру прижизненных изменений в месте введения 10^2, 10^7, $2 \cdot 10^9$ и $1{,}5 \cdot 10^{10}$ м. к. и в регионарном лимфатическом узле, по изменению температуры тела и массы свинок. Наблюдения проводят за животными из опыта по изучению безвредности, которые согласно плану должны умерщвляться на 14—30-е сутки 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.

7. Морфологические изменения у морских свинок изучают макроскопически и патогистологически в динамике после однократного подкожного введения в верхнюю половину бедра культуры испытуемого штамма в малой (10^2 м. к.), средней (10^7 м. к.) и максимальной ($2 \cdot 10^9$ м. к.) дозах двухсуточной агаровой культуры. При изучении остаточной вирулентности и реактогенности исследуемого штамма морфологическим методом при подкожном способе введения максимальной является доза $2 \cdot 10^9$ м. к. Это обусловлено тем, что культуры вакцинных штаммов, в том числе и эталонного вакцинного штамма *EV*, при введении в указанной дозе вызывают у части привитых животных в органах и тканях предельные допустимые изменения.

Приложение 3
(обязательное)

Определение стойкости утраты вирулентности штаммами чумного микроба

Стойкость утраты вирулентности аттенуированными штаммами чумного микроба определяют в опытах на морских свинках путем многократных пассажей при подкожном способе введения испытуемых культур.

Для первого пассажа используют двухсуточную агаровую культуру испытуемого штамма, которую вводят подкожно 2 морским свинкам в дозе 10^9 м. к./мл. Увеличение дозы нецелесообразно. Через 4 сут. животных умерщвляют с помощью хлороформа и вскрывают. Для последующего пассажа у умерщвленных животных забирают регионарные (паховые) лимфатические узлы и селезенки (400—500 мг), помещают в фарфоровую ступку, туда же добавляют 1—2 г стерильного мелкого речного песка.

Помещенные в ступку органы животных растирают пестиком до гомогенного состояния. Затем в ступку вносят 5 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия и суспендируют гомогенат; дают осесть крупным кусочкам тканей и песку на дно ступки, надосадочную жидкость забирают шприцем и вводят подкожно по 0,5 мл 2 морским свинкам (второй пассаж). При осуществления пассажа вторым способом делают посев суспензии на питательный агар. Чашки Петри с высевом суспензии органов помещают в термостат и инкубируют при температуре 26—28 °С в течение 2 сут. Если по истечению срока инкубирования на питательном агаре нет роста *Y. pestis* пассаж повторяют, используя культуру, выделенную от морских свинок предыдущего пассажа, культуру вводят в той же дозе 2 морским свинкам.

После окончания пассажей субкультуру, выделенную после десятого пассажа, а также все субкультуры, выделенные от погибших животных и умерщвленных с явлениями генерализации, изучают по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам и безвредности. Безвредность определяют по укороченной схеме: дозы -10^2, 10^7 и $2 \cdot 10^9$ м. к. для морских свинок и 10^2, 10^5 и 10^7 м. к. – для белых мышей; вскрытие и исследование животных проводят на 7, 14 и 21-е сутки после введения. Методика исследования та же, что и в основном опыте по определению безвредности (прилож. 2).

Приложение 4
(обязательное)

Методика определения безвредности вакцинного штамма чумного микроба при аэрогенной иммунизации морских свинок

1. Для определения безвредности нового вакцинного штамма чумного микроба при аэрогенном способе введения используют морских свинок массой 250—300 г.

Животных выдерживают в карантине, готовят к испытаниям по методике, описанной в прилож. 2.

2. Иммунизацию животных осуществляют аэрогенно взвесью двухсуточной агаровой культуры (2-ой генерации) испытуемого и контрольного (EV) штаммов, выращенных при температуре 26—28 °С, в концентрации 2—8 · 10^9 м. к./мл в 10 % растворе лактозы.

2.1. Приготовление сорбирующей жидкости.

2.1.1. Приготовление фосфатного буфера.

Навески: K_2HPO_4 – 13,1 г,

$KHPO_4$ – 10,0 г.

Каждая навеска растворяется в 100 мл дистиллированной воды. Затем растворы объединяют: 60,0 мл K_2HPO_4 + 40,0 мл $KHPO_4$.

2.1.2. Приготовление 50 %-ного раствора сахарозы:

навеску 50,0 г сахарозы растворяют в дистиллированной воде, объем доводят до 100,0 мл.

2.1.3. Приготовление сорбирующей жидкости:

В стеклянную колбу объемом 250 мл вносят 20,0 мл глицерина, 5,0 мл 50 %-ного раствора сахарозы и 2,0 мл фосфатного буфера. Объем жидкости доводят до 100,0 мл дистиллированной водой. Стерилизуют текущим паром при температуре 100 °С в течение 30 мин. Стерильную сорбирующую жидкость разливают в стерильные аспирационные приборы по 100 мл перед опытом.

2.2. Каждым штаммом прививают по 24 морские свинки. Аспирационная доза (АД) для морской свинки должна быть в пределах 2—8 · 10^6 м. к.

Аэрогенную иммунизацию животных осуществляют в аэродинамической камере, фракционнодисперсный состав (ФДС) аэрозоля – 5—10 мкл. Фактически получаемую аспирационную дозу определяют путем отбора проб аэрозоля из аэродинамической камеры в импинжер с 10 мл сорбирующей жидкости. Содержимое импинжеров и его десяти-

кратных разведений высевают на пластинки с питательном агаром Хоттингера рН 7,2 с сульфитом натрия, по 3 чашки на каждое разведение. После инкубации посевов при температуре 26-28 °С в течение 72 ч производят подсчет выросших колоний. Аспирационную дозу (АД) для морских свинок определяют по формуле:

$$АД = Сб \cdot V \cdot t, \text{ где}$$

Сб – биологическая концентрация аэрозоля, в живых м. к./л;

t – время вдыхания (иммунизации);

V – минутный объем дыхания, равный для морских свинок 0,1 л/мин.

Коэффициент задержки аэрозоля в органах дыхания животных при этом принимают за единицу.

2.3. Параллельно с испытуемым и вакцинным (контроль) штаммами чумного микроба в опыт берут еще одну группу животных (10 штук), которых ингалируют в течение 5 мин стабилизирующем раствором (контроль, плацебо). За всеми животными, привитыми ингаляционно, проводят клинические наблюдения: измеряют температуру тела, взвешивают, по 2 морские свинки умерщвляют путем хлороформирования в те же сроки, как и при подкожном введении.

2.4. Животных вскрывают, исследуют патологоанатомически, патогистологически и бактериологически. Посевы из органов проводят на питательный агар Хоттингера рН 7,2 с сульфитом натрия путем нанесения на поверхность агаровой пластинки отпечатков легких, печени, селезенки, бифуркационного, подчелюстного, паратрахеального и отдаленного-пахового лимфатических узлов; посев крови – мазком-отпечатком отсеченной верхушкой сердца.

Дополнительно кусочки легкого (400—500 мг) растирают в ступке со стерильным речным песком с 0,4—0,5 мл 0,9 %-го раствора хлористого натрия, делают посев 0,1 мл суспензии в чашки с питательным агаром Хоттингера и с питательным агаром, в который добавлено 5 % дефибринированной крови барана.

На такие же питательные среды высевают 0,1 мл крови, разведенной 0,1 мл 0,9 %-ного раствора хлористого натрия. Высев из селезенки и печени осуществляют путем нанесения отпечатков на агар Эндо.

2.5. Посевы на агар Хоттингера инкубируют при температуре 26—28 °С в течение 5 сут, среды с кровью и агар Эндо инкубируют 48 ч при температуре 37 °С. Определяют обсемененность органов животных посторонней микрофлорой. Величину обсемененности органов чумным

микробом качественно регистрируют по количеству колоний в отпечатках: 1+ – до 10 колоний, 2+ – до 100 колоний, 3+ – более 100 колоний, 4+ – сплошной рост, количественно определяют число бактерий на 1 г органа.

Приложение 5
(обязательное)

Методика определения реактогенности вакцинного штамма чумного микроба по стрессорному действию

1. Концентрацию 11-кортикостероидов (11-ОКС) и их биологически активных (свободных) и белковосвязанных фракций в плазме крови морских свинок определяют флуориметрическим методом.

Метод основан на способности кортикостероидов флуоресцировать в растворах крепкой серной кислоты и этилового спирта.

Методика включает следующие два этапа.

2. Обработка посуды, подготовка оборудования и реактивов, построение калибровочной кривой.

Используют специально подготовленную химически чистую посуду; оборудование – флуориметр БИАН-130, измеритель БИАН-100, реактивы – бидистиллированная вода (свежеприготовленная), этанол и метанол (дважды перегнанные), сернокислый цинк, 0,1 н раствор едкого натрия, изооктан эталонный, хлороформ (х. ч.), концентрированная серная кислота, выдерживающая пробу Саваля, гидрокортизон и гепарин медицинские.

3. Перед определением уровня 11-ОКС в плазме крови животных строят калибровочную кривую путем исследования известных концентраций гидрокортизона, начиная с 0,08 до 0,8 мкг/мл в бидистиллированной воде. Объем пробы 5 мл. Определение проводят в трех повторностях. Контроль 5 мл бидистиллированной воды. К 5 мл каждой пробы гидрокортизона добавляют по 15 мл хлороформа, встряхивают 1 мин, отсасывают верхний слой вакуумным насосом, отмеряют 10 мл хлороформного экстракта и добавляют по 6 мл охлажденного до температуры (4 ± 2) °С этанолсернокислого реагента (1 : 3). Встряхивают 1 мин.

Затем хлороформный экстракт отсасывают, а этанолсернокислую смесь переносят в кювету и измеряют флуоресценцию на флуориметре БИАН-130 или другом, подобном ему по основным техническим характеристикам, с использованием первичного светофильтра 475 нм, а вторичного – 530 нм против контрольной пробы (бидистиллированная вода) на реактивы. Определяют разность флуоресценции стандартной пробы и контрольной, подсчитывают среднее значение показания прибора и строят калибровочную кривую, откладывая на оси абсцисс интенсивность флуоресценции, на оси ординат – концентрацию гидрокор-

тизона. Калибровочную кривую строят заново при замене партии реактивов и при проведении исследований в разные сезоны года.

4. Морских свинок массой (250 ± 50) г распределяют на три равнозначные по массе и полу группы. По 10 животных иммунизируют подкожно 10^7 м. к. двухсуточных агаровых культур в объеме 0,5 мл испытуемого и контрольного штаммов чумного микроба. Третьей группе из 10 животных вводят 0,5 мл плацебо (0,9 %-ный раствор хлорида натрия).

Получение и хранение плазмы. Через 1 сут. после введения испытуемых штаммов у морских свинок берут кровь из сердца под хлороформовым наркозом в объеме 5—6 мл в центрифужные пробирки, содержащие гепарин, из расчета 20 ед. на 1 мл крови. Взятие крови проводят в 8—9 ч утра, натощак.

Для определения кортикостероидов используют плазму крови. Плазму от клеточных элементов крови отделяют путем центрифугирования при (1400 ± 50) G в течение 15 мин. Исследование проводят сразу или хранят плазму в замороженном состоянии при температуре минус 10—20 °С не более 3 сут.

5. Определение общих 11-ОКС.

К 1 мл плазмы крови (опытная проба) добавляют 2 мл бидистиллированной воды (объем пробы 3 мл) и 6 мл изооктана, встряхивают 1 мин. Изооктан (верхнюю фракцию) отсасывают вакуумным насосом, а из нижней фракции отсасывают 1,5 мл (половина пробы) и к ней добавляют 15 мл хлороформа. Смесь встряхивают в течение1 мин и после расслоения верхний слой отсасывают. Затем хлороформенный экстракт (нижняя фракция) переливают в чистую пробирку, добавляют 1 мл 0,1 н раствора едкого натрия, встряхивают в течение 15 с (не более). Из хлороформного экстракта отбирают 10 мл в чистую пробирку и добавляют 6 мл охлажденного до температуры (4 ± 2) °С этанолсернокислого реактива (1 : 3). Пробу встряхивают 1 мин, хлороформный экстракт отсасывают. Через 1—2 ч флуоресценцию пробы замеряют на флуориметре и сравнивают с контрольной пробой. Контрольную пробу готовят аналогично опытной, но вместо крови берут 1 мл бидистиллированной воды.

6. Определение свободных 11-ОКС.

К 1 мл плазмы крови (опытная проба) добавляют 2 мл бидистиллированной воды (объем пробы 3 мл) и 6 мл изооктана, встряхивают в течение 1 мин. После расслаивания эмульсии, расположенный в верхней фракции изооктан отсасывают вакуумным насосом; из нижней фракции отбирают 1,5 мл (половина пробы) и к ним добавляют 2,5 мл бидистил-

лированной воды и 0,5 мл свежеприготовленного раствора сернокислого цинка (2,8 г $ZnSO_4$ растворяют в 7 мл бидистиллированной воды) и перемешивают. Смесь центрифугируют при (1400±50) g в течение 15 мин и надосадочную жидкость, которая должна быть прозрачной, осторожно сливают в пробирку, добавляют к ней 15 мл хлороформа. Из хлороформного экстракта отбирают по 10 мл в чистую пробирку и добавляют 6 мл охлажденного до (4 ± 1) °С этанолсернокислого реактива (1 : 3). Пробу встряхивают 1 мин, хлороформный экстракт отсасывают. Через 1—2 ч флуоресценцию пробы замеряют на флуориметре и сравнивают с контрольной пробой, которую готовят аналогично, но вместо крови берут 1 мл бидистиллированной воды.

Расчет количества 11-ОКС проводят по калибровочной кривой, построенной для гидрокортизона. Находят разность показаний прибора по флуоресценции каждой опытной пробы с контрольной для общих и свободных 11-ОКС. Пересчитывают показания флуоресценции на 1 мл испытуемой плазмы, т. е. разницу флуоресценции отнимают от контрольной пробы, умножают на 2, т. к. исследовали половину пробы. Затем составляют таблицу и проводят расчеты концентрации 11-ОКС (табл. 1).

На оси абсцисс калибровочной кривой находят значение показаний прибора в условных единицах, а по ним находят на оси ординат концентрацию гидрокортизона в 1 мл для общих и свободных 11-ОКС. Количество 11-ОКС перерасчитывают на 100 мл плазмы. Концентрацию кортикостероидов, связанных с белками крови, определяют по разнице между количеством общих и свободных 11-ОКС. Высчитывают также для каждой пробы коэффициент отношения свободных фракций к белковосвязанным. Затем высчитывают средние арифметические значения (М) концентрации общих и связанных 11-ОКС для групп животных, привитых культурами испытуемого и эталонного штаммов, ошибку средних арифметических (m) и достоверность различий (p) показателей для испытуемого и контрольного штаммов.

Результаты исследований учитывают, если в контрольной группе животных (плацебо) уровень общих 11-ОКС не превышает 30 мкг %, а отношение биологически активных фракций к белковосвязанным не выше 1.

Таблица 1

Расчет концентрации 11-оксикортикостероидов (11-ОКС)

Номера проб	Разность показаний прибора для опытной и контрольной проб (относительные единицы)		Концентрация 11-ОКС (мкг%)	
	Общие (К=20)	Свободные (К=22)	Общие 11-ОКС	Свободные 11-ОКС
1	52—20=32·2=64	32—22=10 · 2=20	21,2	6,5
2	57—20=37·2=74	32—20=10 · 2=20	24,7	6,5
3	60—20=40·2=80	30—22=8 · 2==16	26,5	5,2
4	48—20=28·2=56	32—22=10 · 2=20	19,0	6,5
5	47—20=27·2=54	31—22=9 · 2=18	18,0	6,0
6	44—20=24·2=48	33—22=11 · 2=22	16	7,5
7	49—20=29·2=58	34—22=12 · 2=24	19,5	8,0
8	51—20=31·2=62	25—22=3 · 2=6	26,7	2,3
9	43—20=23·2=46	32—22=10 · 2=20	15,5	6,5
10	44—20=24·2=48	31—22=9 · 2=18	16	6,0
n=10			ΣМ=197,1 М=19,7	ΣМ =61,0 М=6,1

Условные обозначения:

К – контроль на реактивы;

n – число проб;

ΣМ – сумма концентраций 11-ОКС по 10 определениям;

М – средний арифметический показатель.

Приложение 6
(обязательное)

Методы определения влияния вакцинного штамма чумного микроба на иммунную систему морских свинок

1. Для изучения пролиферации и численности популяций лимфоцитов морских свинок иммунизируют однократно $1 \cdot 10^5$ м. к. односуточной агаровой культурой испытуемого штамма и вакцинного штамма EV. Для проведения исследований по ниже перечисленным тестам испытуемую культуру каждого штамма вводят 10 животным.

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

Группы животных формируется методом случайной выборки равнозначных по полу и массе.

2. 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 наливают в пробирку на водный раствор верографина плотностью в (1,08 ± 0,002) г/мл в соотношении 2 : 1, центрифугируют (15 ± 1) мин при (450 ± 25) g, затем пастеровской пипеткой собирают образовавшееся над слоем верографина беловатое кольцо лимфоцитов. Количество Т- и В-лимфоцитов определяют одним из приведенных ниже методов.

3. Получение взвеси клеток селезенки и тимуса

Морских свинок умерщвляют с помощью хлороформа. Извлекают селезенку и тимус и помещают их в гомогенизаторы. Осторожным раздавливанием приготовляют взвесь клеток из расчета 1 мл среды 199 на 50 мг ткани селезенки или тимуса. Полученную суспензию фильтруют через 2 слоя капронового фильтра, дважды отмывают средой 199 путем центрифугирования при (450±25) g в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют.

4. Определение пролиферативной активности лимфоцитов.

4.1. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Используют для оценки функциональной активности лимфоцитов.

4.1.1. Культуры спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов, выделенных из крови иммунных и контрольных животных, доводят до концентрации $5 \cdot 10^6$ к./мл средой культивирования, состоящей из среды RPMI 1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-

глутамина, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Суспензию клеток разливают в 96-луночную пластиковую панель по 0,2 мл в лунку (по три лунки на каждый образец). В опытные пробы для стимуляции лимфоцитов в качестве неспецифических митогенов вносят по 10—15 мкг/мл ФГА или КОН-А в концентрации 1—15 мкг/мл. В качестве специфического антигена вносят по 100 мкг/мл ультразвуковых дезинтегрантов (УЗД) *Y. pestis* (соответственно испытуемого и контрольного штаммов в коцентрации $2,5 \cdot 10^8$ и $2,5 \cdot 10^9$ м. к./мл).

4.1.2. УЗД получают путем трехкратного воздействия ультразвуком 44 кГц в течение 1 мин взвеси испытуемого и контрольного штаммов в 0,9 %-ом растворе хлорида натрия. Контролем служат культуры без добавления митогенов и антигенов. Инкубацию проводят в CO_2-инкубаторе (5 % CO_2) при температуре (37 ± 2) °С в течение 72 ч. Затем в лунки добавляют 3Н-тимидин в объеме 25 мкг (1—2 мкКи) в среде RPMI – 1640 на лунку и инкубируют в тех же условиях еще 24 ч. По окончании инкубации клетки переносят на фильтры с помощью прибора «Cell Harwestr», фильтры после сушки в термостате при темературе (37 ± 2) ° С помещают во флаконы, содержащие по 3 мл толуольного сцинтиллятора (на 1 мл толуола 0,2 г РО-РОР и 5 г РРО). Радиоактивность (имп/мин) образцов измеряют с помощью В-счетчика. Учет реакции можно проводить визуально, определяя процент бластных форм лимфоцитов. Интенсивность РБТЛ выражают в индексах стимуляции (ИС) РБТЛ, которые подсчитывают по формуле:

$$\text{ИС РБТЛ} = \frac{\text{имп/мин в культуре с митогеном (антигеном)}}{\text{имп/мин в культуре без митогена (антигена)}}$$

4.2. Определение пролиферативной активности лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Принцип метода основан на вторичной флуоресценции, которая возникает в результате окрашивания ДНК лимфоцитов иммунных и контрольных животных специфическим флуорохромом и измерением ее содержания в лимфоцитах в различных фазах клеточного деления.

4.2.1. Приготовление растворов флуорохромов

Раствор А. Готовят 0,0025 %-ный раствор этидиум бромида в 0,1 М растворе трис-буфера рН 7,4, содержащем 0,6 % хлорида натрия. Величина рН 7,4 достигается добавлением 1 н раствора хлористого натрия.

Раствор Б. Готовят 0,005 %-ный раствор митрамицина в 12,5 %-ном растворе этилового спирта, содержащем 7,5 мМ хлористого магния 6-водного. Величина рН 5,5 достигается добавлением 0,01 н раствора

хлорида натрия. Приготовленные растворы хранят при температуре (4 ± 2) °С не более месяца.

4.2.2. Фиксация лимфоцитов.

Полученные клеточные суспензии с концентрацией 10^6 лимфоцитов в 1 мл фиксируют путем добавления (70 ± 1)° этилового спирта (использование другого фиксатора недопустимо), охлажденного до (4 ± 2) °С, из расчета 4,5 мл на 0,5 мл клеточной суспензии, выделенной от вакцинированных испытуемым и контрольным штаммами животных. Смеси перемешивают на вибрационной мешалке, выдерживают при температуре (4 ± 2) °С не менее 30 мин. Фиксированные клетки можно хранить при температуре (4 ± 2) °С до 10 сут.

4.2.3. Окраска ДНК лимфоцитов флуорохромами.

Фиксированные этиловым спиртом лимфоциты (5 мл) осаждают путем центрифугирования на центрифуге в течение (3 ± 1) мин при (1000 ± 25) g, удаляют надосадочную жидкость. Затем к осадку добавляют 0,5 мл раствора флуорохрома А, перемешивают на вибрационной мешалке 30—40 с и выдерживают при температуре (22 ± 2)°С 10 мин. К смеси лимфоцитов и флуорохрома А добавляют 0,5 мл флуорохрома Б, также перемешивают и выдерживают при температуре (22 ± 2)°С 5 мин. Пробирки необходимо закрывать парафиновыми бумажками. После окраски суспензии лимфоцитов готовы к анализу на приборе и должны быть использованы в течение 2 ч.

4.2.4. Подготовка окрашенных клеток к исследованию.

Суспензии окрашенных лимфоцитов в пробирках помещают в ультразвуковую ванну и подвергают обработке 15 с для разрушения агломератов, образовавшихся при центрифугировании, затем фильтруют через фильтры с размером пор от 45 до 50 мкм.

Процентное соотношение лимфоцитов в фазах клеточного деления регистрируют с помощью проточного цитофлуориметра PHY WE JCPP 22 или другой марки.

Определение процентного соотношения пролиферирующих (фазы S и G_2 + M) и непролиферирующих (фазы G_0/G_1) лимфоцитов проводят путем расчета гистограмм, высвечивающихся в процессе эксперимента на экране дисплея многоканального анализатора импульсов с помощью математической модели.

Общее количество клеток, зарегистрированное анализатором, определяется суммарным количеством клеток, набранных в каждом из каналов:

$$N_{общ.} = \sum_{X_i=X_1}^{X_5} Nx_i \cdot \Delta x$$

В свою очередь количество клеток в фазах клеточного цикла G_0/G_1, S и G_2 + M определяется площадью, ограниченной соответствующей кривой.

Количество клеток в S – фазе определяется площадью трапеции и может быть вычислено путем умножения основания этой трапеции на высоту:

$$Ns = N(X_3) \cdot (X_4 - X_2) = N(X_3) \cdot X_2$$

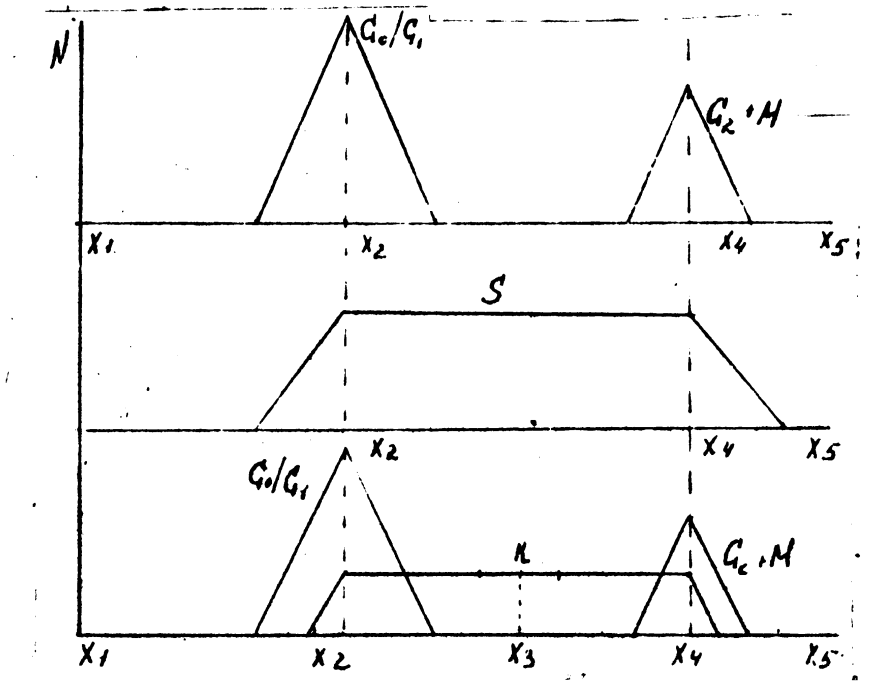


Рис.1. Условные обозначения: N – количество сигналов (клеток); X – количество ДНК в относительных единицах (каналах), выражается через интенсивность флуоресценции, а затем через амплитуду электрического импульсного сигнала на выходе ФЭУ; соответственно амплитуде сигнала ставят определенный канал анализатора импульсов, сигнал отсчитывается анализатором; X_1 – номер произвольного канала до начала распределения (выбирается одинаково для опытной и контрольной

пробы); X_2 – номер канала максимума пика G_0/G_1,определяется на гистограмме при помощи светящейся метки (курсора) и корректируется, исходя из значения коэффициента вариации гауссовского распределения G_0/G_1; X_3 – номер канала по середине S- фазы, X_4 – номер канала максимума пика G_2 + M.

$$X_2 + \frac{X_4 - X_2}{2} = X_2 + \frac{X_2}{2}$$

Эти клетки содержат количество ДНК вдвое больше, чем диплоидные, поэтому $X_4 = 2X_2$; X_5 – номер произвольного канала после распределения (выбирается одинаково в опыте и контроле).

Поскольку в различных точках S – фазы регистрируется неодинаковое число клеток, необходимо заменить число N (X_3) на усредненную величину по нескольким каналам (K) и выбрать K равным от 10 до 20, тогда

$$N_s = \frac{X_2}{K+1} \cdot \sum_{X_i = X_3 - K/2}^{X_3 + K/2} \cdot NX_i$$

Поскольку распределения G_0/G_1 и S перекрываются, число клеток в фазе G_0/G_1 может быть определено путем вычитания половины площади, занятой фазой S, из общей площади до канала X_3:

$$N_{G_0/G_1} = \left(\sum_{X_i = X_1}^{X_3} NX_i \cdot \Delta X \right) - N_{s/2}$$

Количество клеток в фазах $G_2 + M$ определяется так:

$$N_{G_2+M} = N_{общ.} - (N_S + N_{G_0/G_1})$$

Процент клеток в фазах $S, G_2 + M$ и G_0/G_1 определяют путем деления соответствующих площадей на общую площадь гистограммы и умножения на 100 %

$$N_{G_0/G_1}\,\% = \frac{N_{G_0/G_1}}{N_{общ.}} \cdot 100\,\%$$

Все операции расчета сводятся к определению с помощью курсора номера каналов X_1, X_2, X_3, X_3-K/2, X_3+K/2, X_5 и вычислению с помощью этого же курсора ограниченных ими площадей:

$$N_s\,\% = \frac{N_s}{N_{общ.}} \cdot 100\,\%$$

$$N_{G_2+M}\,\% = \frac{N_{G_2+M}}{N_{общ.}} \cdot 100\,\% = 100\,\% - N_s\,\% - N_{G_0/G_1}$$

$$\sum_{X_i=X_1}^{X_5} N_{xi} \cdot \Delta X \qquad \sum_{X_i=X_1}^{X_3} N_{xi} \cdot \Delta X \qquad \sum_{X_i=X_3-K/2}^{X_3+K/2} N_{xi}$$

Для этого не требуется длительного суммирования значительного числа клеток в каждом из каналов. Достаточно последовательно поместить курсор в начальную и конечную точки гистограммы, ограничивающие требуемый участок, и нажатием специальной кнопки,указанной в инструкции к любому анализатору, определить площадь этого участка.

5. Определение количества Т- и В-лимфоцитов цитотоксическим тестом.

5.1. 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 Трипановый синий, проникая внутрь клетки, окрашивает ее. Жизнеспособные с интактной мембраной клетки этим красителем не окрашиваются.

5.1.1. Определение количества Т-лимфоцитов.

Коммерческую поликлональную сыворотку против Т-лимфоцитов (институт им. Г. Н. Габричевского) разводят средой 199 до рабочей концентрации, указанной на этикетке. В центиружной пробирке или в лунке панели смешать 60 мкл сыворотки, 20 мкл исследуемой взвеси лимфоцитов (концентрация 10^7 кл/мл) и 20 мкл комплемента кролика в разведении 1 : 3. В контрольные пробирки или лунки вносят 20 мкл взвеси лимфоцитов (концентрация 10^7 кл/мл), 20 мкл взвеси комплемен-

та и 60 мкл среды 199. Смеси перемешивают и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 2) °С 25—30 мин. В каждую пробирку или лунку добавить по 1200 мкл 0,5 %-ного раствора трипанового синего (500 мг красителя растворить в 100 мл горячего (80—90 °С) 0,9 %-ного раствора хлорида натрия; перемешать 10 мин на магнитной мешалке и профильтровать через фильтровальную бумагу). Через 30—60 с поместить взвесь из лунки в счетную камеру. Определяют число погибших клеток, вычисляют их процент от общего количества клеток в препарате, подсчитывают цитотоксический индекс (ЦТИ) по формуле:

$$\text{ЦТИ} = \frac{\%\text{ убитых клеток в опыте} - \%\text{ убитых клеток в контроле}}{\%\text{ убитых клеток в контроле}} \times 100$$

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

5.1.2. Определение количества В-лимфоцитов.

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

6. Определение фагоцитарной активности макрофагов.

Фагоцитарную активность определяют по проценту фагоцитирующих клеток и количеству захваченных частиц на один фагоцит.

Внутрибюшинно уколом по средней линии живота морской свинке вводят 20 мл среды 199 с гепарином (10 ед/мл). Брюшко массируют для смыва клеток, не вынимая иглы, и эксудат отсасывают шприцем.

Клетки перитонеального экссудата (КПЭ) берут асептически от морских свинок опытной и контрольной групп и помещают в 5 мл среды 199, содержащей 5 МЕ гепарина в 1 мл, в пробирки, стоящие на льду. Не используют экссудаты, содержащие эритроциты. После осаждения центрифугированием (при 150 g, в течение 10 мин) клетки ресуспендируют в 5 мл среды 199 с 10 % сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиками (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Концентрацию клеток доводят до $1\text{-}2 \cdot 10^6$ клеток/мл и суспензию разливают по 2 мл в чашки Петри диаметром 40 мм. Чашки помещают в термостат с температурой 37 °С с содержанием 5 % CO_2. Через 60 мин суспензию сливают, смывают с чашки Петри неприлипшие

клетки раствором Хенкса, добавляют 2 мл свежей среды 199 и оставляют на 18—24 ч в термостате с 5—7 % CO_2 при температуре 37 °С. Клетки для исследования фагоцитоза можно получить также на покровных стеклах, помещенных в пробирки с 1,5—2 мл КЭП.

Объектом фагоцитоза служат эритроциты барана, *Y. pestis* EV. Суточную культуру живых *Y. pestis* EV отмывают не менее 3-х раз 0,9 %-ным раствором хлорида натрия, осаждают путем центрифугирования на центрифуге при 150 g в течение 5 мин, ресуспендируют в нем и определяют концентрацию суспензии по стандарту оптической мутности. Взвесь разводят средой 199 до концентрации $1 \cdot 10^{10}$ м. к./мл. Эритроциты барана (ЭБ) трижды отмывают 0,9 %-ным раствором хлорида натрия, осаждают путем центрифугирования на центрифуге при 150 g в течение 5 мин. Готовят 0,5 %-ную взвесь ЭБ на среде 199. В чашки Петри, содержащие КПЭ, наливают 1 мл свежей среды 199 и вносят по 1 мл взвеси ЭБ или соответствующих микроорганизмов. Через 30—60 мин чашки ополаскивают холодным раствором Хенкса, просушивают и фиксируют 10 мин метанолом. Окрашивают азур-эозином по Романовскому. Просматривают не менее 200 клеток, подсчитывают фагоцитирующие клетки и количество содержащихся в них ЭБ или микробов.

Результаты выражают процентом фагоцитирующих клеток (ПФ), фагоцитарным числом (ФЧ), которое определяется количеством частиц на один фагоцит, абсолютным фагоцитарным показателем (АФП) – суммарным показателем активности полиморфноядерных лейкоцитов, которое рассчитывают по формуле:

АФП=количество фагоцитирующих клеток в 1 мкл крови х ФЧ

Пример:

а) Общие количество лейкоцитов в 1 мкл крови – 500,

содержание полиморфноядерных лейкоцитов – 60 %, ПФ – 80 %, ФЧ – 5.

$$\text{Количество полиморфноядерных лейкоцитов} = \frac{500 \cdot 60}{100} = 300;$$

б) полиморфноядерных лейкоцитов 300 – 100 %, фагоцитирующих (ПФ)– 80 %, т. е. количество фагоцитирующих полиморфноядерных лейкоцитов $= \frac{300 \cdot 80}{100} = 240;$

в) АФП = 240 · 5=1200

7. Определение влияния вакцинного штамма на развитие клеточного и гуморального иммунного ответа на гетерологичный антиген.

7.1. Определение влияния вакцинного штамма на развитие клеточного иммунного ответа на гетерологичный антиген по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана (ЭБ).

Мышей разделить на три группы. Мышей первой группы иммунизировать исследуемой вакциной, мыши второй группы – интактные (положительный контроль) , мыши третьей группы – интактные с введением только разрешающей дозы ЭБ (контроль). Мышам 1-ой и 2-ой групп вводят ЭБ без адьюванта Фрейнда в дозе 10^7 кл/на мышь в объеме 0,1 мл в межлопаточную область подкожно , параллельно внутрибрюшинно (возможны и другие способы введения – перорально, внутривенно, подкожно) ввести исследуемую вакцину. Разрешающую дозу ЭБ (10^8 кл/на мышь) ввести на 5-й день в объеме 0,02 мл в подушечку задней лапы, в контрлатеральную – 0,9 % раствор хлорида натрия всем трем группам животных.

Учет результатов – местную реакцию на введение разрешающей дозы ЭБ оценивать через 18—20 ч путем определения веса опытной (P_o) и контрольных (Рк) лапок. Интенсивность местной реакции определяют по индексу (ИР), рассчитываемой по формуле:

$$ИР = \frac{P_0 - P_к}{P_к} \cdot 100\%$$

Оценка результатов. Значение ИР в опытной (1-ой) группе выше двух его значений в положительном контроле (2-я группа) следует оценивать как выраженный иммуностимулирующий эффект вакцины. При значении ИР равного контролю (3-я группа) или менее положительного контроля – как выраженный иммуносупрессирующий эффект вакцинации.

7.2. Влияние вакцинного штамма на развитие гуморального ответа на гетерологичный антиген.

Определение поликлональной активности В-лимфоцитов.

Для оценки этого показателя определяют число клеток, продуцирующих антитела к эритроцитам барана (АОК). Необходимо подчеркнуть, что иммунизация мышей эритроцитами барана в этих опытах не производится, а определяется 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.

7.2.1. Выявление антителообразуюших клеток методом локального гемолиза в геле.

Эритроциты барана отмыть 0,9 %-ным раствором хлорида натрия путем центрифугирования 7 мин при 400 g 3 раза, к 0,9 %-ному раствору агарозы* добавить из расчета 2—3 · 10^7 эритроцитов барана в 1 мл. Полученную рабочую смесь разлить по 2,5 мл в пробирки, помещенные в водяную баню при температуре 43—44 °С. В каждую пробирку добавить по 0,2 мл взвеси исследуемых клеток селезенки (концентрация 10^7 кл/мл), перемешать и вылить на чашку Петри, равномерно распределяя ее по дну. Через 5 мин чашки поместить в термостат при температуре (37 ± 2) °С на 1 час. Затем в каждую чашку вылить 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 подсчитать число зон гемолиза на каждой чашке.

Учет результатов. Рассчитать число антителообразующих клеток на селезенку и на 1 млн ядросодержащих клеток (ЯСК) селезенки. Пример результатов опыта этого типа представлен в таблице:

№ группы	Вакцинация	Срок после вакцинации (сут)	Число АОК на селезенку	P	Индекс поликлональной стимуляции
1	(контр)	–	120 ± 24	–	1
2	+	3	198 ± 39	0 ,05	1,65
3	+	7	246 ± 36	0,05	2,05
4	+	10	154 ± 40	0,05	1,28
5	+	15	105 ± 27	0,05	0,87
6	+	20	116 ± 17	0,05	0,96

Оценка результатов.

В этом опыте обнаружено на 3—7 день после прививки выраженное стимулирующее действие вакцины на функциональное состояние В-лимфоцитов.

Кол-во	Масса агарозы	Объем	Объем

* Приготовление 0,9 %-ного раствора агарозы: навеску сухой агарозы (см. таблицу) смешать с дистиллированной водой, смесь кипятить на водяной бане до полного растворения агарозы; перенести емкость с раствором в водяную баню с температурой 43—44 °С, добавить 10-кратный раствор Хенкса, pH раствора довести до 7,2 1% -ным раствором KH_2PO_4 или NaOH (по цвету индикатора, присутствующего в растворе Хенкса).

чашек		дистиллированной воды	10-кратного раствора Хенкса
10	225 мг	22,5 мл	2,5 мл

7.2.2. Определение функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов.

Метод оценки активности Т-супрессоров и Т-хелперов основан на исследовании их способности соответственно угнетать или стимулировать in vitro зрелые клетки, продуцирующие антитела к эритроцитам барана.

Тест-объектом служат клетки селезенки от 3 мышей, иммунизированных внутривенно эритроцитами барана (2×10^8 клеток на мышь). Для иммунизации необходимо использовать сингенных мышей, иммунизированных испытуемым и контрольным штаммами.

Иммунизированных ЭБ мышей убить хлороформом, из их селезенок приготовить общую клеточную взвесь (концентрация 10^7 кл/мл) по описанному выше методу (п. 2.2). Клетки отмыть 1 раз средой 199 путем центрифугирования в течение 7 мин, при 400 g. Довести концентрацию до 10^7 кл./мл, 0,2 мл этой взвеси смешать в центрифужной пробирке с 0,2 мл взвеси спленоцитов той же концентрации от иммунизированных испытуемой вакциной животных. В контрольной пробирке к 0,2 мл первой взвеси добавить 0,2 мл среды 199.Все пробирки инкубировать в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 2)\ ^0$С, затем их центрифугировать 7 мин при 400 g. Надосадок слить, в каждую пробирку добавить по 2,5 мл рабочей смеси агарозы с эритроцитами барана (см. п. 2.8). Содержимое пробирки перемешать осторожным встряхиванием и немедленно вылить в чашку Петри, равномерно распределяя смесь по дну. Чашку оставить при температуре 18—20 °С на 5 мин, затем инкубировать 90 мин при температуре (37 ± 2) °С. Далее в каждую чашку налить по 2,5 мл разведенного комплемента морской свинки (сухой комплемент разводят средой 199 в 5 раз, свежезамороженный – в 10 раз) и продолжить инкубацию при температуре (37±2) °С еще в течение 30 мин, после чего в проходящем электрическом свете подсчитать число зон гемолиза в каждой чашке.

Учет результатов.

Подсчитать индекс эффективности (ИЭ) по формуле:

$$ИЭ = \frac{\text{число АОК в опыте}}{\text{число АОК в контроле}}$$

Пример результатов опытов этого типа представлены в таблице:

№ опыта	Число АОК на чашку		P	Индекс эффективности
	В контроле	В опыте		
1	148 ± 36	81 ± 30	< 0,05	0,55
2	132 ± 40	186 ± 24	< 0,05	1,41

Оценка результатов.

В эксперименте № I число АОК на чашку в опыте было меньше, чем в контроле; индекс эффективности составил 0,55, что указывает на высокую активность Т-супрессоров в исследуемой селезенке. В эксперименте № 2 число АОК в опыте было больше, чем в контроле; индекс эффективности составил 1,41. Это указывает на повышенную активность Т-хелперов в исследуемой селезенке.

7.2.3. Исследование влияния испытуемого штамма на иммунореактивность – развитие гуморального иммунного ответа на гетерологичный антиген.

Определение АОК к эритроцитам барана (ЭБ) гетерологичному Т-зависимому антигену.

Для проведения этих экспериментов мышей разделить на 2 группы по 10 штук в каждой. Мыши 1-ой группы иммунизированы изучаемым вакцинным препаратом, мыши 2-ой группы интактные (контрольные). Мышам обеих групп ввести внутривенно по $2 \cdot 10^7$ эритроцитов барана. Иммунный ответ на гетерологичный антиген оценивать через 4 суток после введения эритроцитов. Методика определения числа АОК – см. п. 2.8.

Учет результатов.

Пример анализа результатов опыта приведен в таблице:

Группы мышей	Число АОК на селезенку к эритроцитам барана
1	1568026 ± 70*
2	24400 ± 4390

* отличие значимо ($p<0,05$)

Оценка результатов.

Приведенные в таблице результаты показывают, что у вакцинированных животных иммунный ответ на гетерологичный антиген угнетен. Это является признаком временного иммунодефицита, обусловленного увеличением количества и функциональной активности Т-супрессоров и (или) снижением количества и функциональной активности Т-хелперов.

Приложение 7
(обязательное)

Методы определения иммуногенной активности вакцинного штамма чумного микроба

Перед испытанием штамма на иммуногенность лабораторных животных взвешивают, отбирают морских свинок массой 250—350 г и белых мышей массой 18—22 г, распределяют их по показателю массы на равнозначные группы для каждой дозы испытуемого и контрольного штаммов, для каждого срока исследования. Для иммунизации и заражения используют двухсуточные агаровые культуры второй генерации. Всех погибших после заражения иммунизированных животных вскрывают и подвергают бактериологическому исследованию.

1. Определение иммуногенности при подкожном способе иммунизации морских свинок и белых мышей.

1.1. Определение минимальной иммунизирующей дозы и расчетной величины $ЕД_{50}$.

Минимальную иммунизирующую дозу и расчет $ЕД_{50}$ исследуемого штамма для морских свинок определяют в одном опыте. Морских свинок иммунизируют подкожно в область верхней трети правого бедра двухсуточной агаровой культурой исследуемого штамма в дозах $4 \cdot 10$, $2 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$ и $5 \cdot 10^3$ м. к. по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича в объеме 0,5 мл. Белых мышей для определения $ЕД_{50}$ иммунизируют тоже подкожно в область верхней трети правого бедра дозами $2 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$ и $2{,}5 \cdot 10^4$ м. к. в объеме 0,2 мл.

На каждую дозу испытуемого и эталонного вакцинного штаммов берут по 10 животных.

Заражение животных проводят на 21-е сут после иммунизации подкожно в область верхней трети левого бедра в дозе, соответствующей 200 DCL вирулентного штамма чумного микроба (1 DCL не должна превышать 100 микробов). Вирулентную культуру животным вводят в тех же объемах, что и вакцинирующую дозу. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 20 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологическим методом. Величину $ЕД_{50}$ исследуемого вакцинного штамма вычисляют по методу Кербера, описанному И. П. Ашмариным и А. А. Воробьевым (1962).

1.2. Определение скорости формирования специфического иммунитета у морских свинок.

Для оценки иммуногенных свойств вакцинного штамма важно определить скорость наступления иммунитета. Культурой каждого штамма иммунизируют подкожно по 30 морских свинок дозой $5 \cdot 10^3$ м. к. в объеме 0,5 мл. Заражение животных проводят двухсуточной культурой вирулентного штамма в дозе, соответствующей 200 DCL в объеме 0,5 мл на 3, 5 и 7-е сутки после иммунизации (в каждый срок по 10 свинок). Одновременно с иммунизированными в каждый срок заражают по 5 контрольных (неиммунизированных) морских свинок в дозах, соответствующих 1 DCL и 200 DCL. Наблюдение за зараженными животными проводят в течение 20 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологически. Затем полученные данные обрабатывают статистически – определяют по методу Кербера сутки, на которые штаммы защищают 50 % опытных животных.

1.3. Определение напряженности иммунитета у морских свинок и белых мышей

Для определения напряженности иммунитета животных иммунизируют двухсуточными агаровыми культурами испытуемого и контрольного штаммов подкожным способом: морских свинок в дозе $5 \cdot 10^3$ в объеме 0,5 мл, белых мышей – 10^4 м. к. в объеме 0,2 мл. Культурой каждого штамма иммунизируют по 40 свинок – по 1- на каждую заражающую дозу. На 21-е сутки после иммунизации животных заражают культурой вирулентного штамма Y. pestis в 4-х дозах: морских свинок – 10^2, 10^4, 10^6, 10^8 м. к. в объеме 0,5 мл и белых мышей в объеме 0,2 мл. Одновременно заражают интактных (контрольных) животных в дозах 1, 5, 25 и 125 м. к. в том же объеме, как и для иммунизированных животных. Наблюдения за зараженными животными проводят в течение 20 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологическим методом. Результаты обрабатываются статистически – рассчитывают величину LD_{50} вирулентного штамма, полученную на иммунизированных и интактных животных, определяют величину DCL.

1.4. Определение длительности иммунитета на морских свинках.

Морских свинок по 60 штук для испытуемого и контрольного штаммов иммунизируют подкожно дозой $5 \cdot 10^3$ м. к. в объеме 0,5 мл. Заражение животных проводят 200 DCL вирулентного штамма чумного 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 иммунизированными в каждый срок заражают по 10 контрольных морских свинок: 5 – 1 DCL и 5 – 200 DCL. О длительности иммунитета судят по количеству животных, выживших в каждый срок заражения.

2. Определение иммуногенности при аэрогенном способе иммунизации морских свинок.

Ингаляционную иммунизацию осуществляют в аэродинамической камере по методике, описанной в прилож. 4.

Аспирационная доза должна составлять $2—8 \cdot 10^6$ колониеобразующих клеток. Каждым штаммом (испытуемым и контрольным) иммунизируют по 12 морских свинок. Через 21 сут после иммунизации по 10 животных, иммунизированных каждым штаммом, заражают 10 CT_{50} вирулентного штамма чумного микроба в аэродинамической камере. Одновременно с иммунизированными этой же дозой заражают 10 контрольных морских свинок. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 20 сут. Погибших животных вскрывают и исследуют бактериологическим методом. Вычисляют процент выживших животных.

gost.e-ecolog.ru