Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий

Методические указания
МУК 4.2.2317—08

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий

Методические указания
МУК 4.2.2317—08

ББК 52.64
О80

О80 **Отбор,** проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—43 с.

ISBN 978—5—7508—0800—7

1. Разработаны: Федеральным государственным учреждением науки «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (д. м. н. Р. П. Чупринина, к. м. н. И. А. Алексеева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 3 от 6 декабря 2007 г.).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 18 января 2008 г.

4. Введены взамен документа – «Инструкция по отбору, проверке и хранению производственных штаммов коклюшных бактерий», МЗ СССР, 1987 г.

ББК 52.64

ISBN 978—5—7508—0800—7

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 5
2. Требования к производственным штаммам коклюшных бактерий *Bordetella pertussis* 6
2.1. Морфология 6
2.2. Культуральные свойства 6
2.3. Ферментативные свойства 6
2.4. Серологические свойства 6
2.5. Антигенная структура (серотипы) 7
2.6. Гемагглютинирующая и гемолитическая активность 7
2.7. Дермонекротические свойства 7
2.8. Вирулентность 7
2.9. Токсичность 8
2.10. Защитные свойства 9
3. Требования к производственным штаммам паракоклюшных бактерий *Bordetella parapertussis* 9
3.1. Морфология 9
3.2. Культуральные свойства 9
3.3. Ферментативные свойства 10
3.4. Серологические свойства 10
3.5. Антигенная структура (серотипы) 10
3.6. Гемагглютинирующая и гемолитическая активность 10
3.7. Дермонекротические свойства 10
3.8. Вирулентность 11
4. Требования к производственным штаммам бронхисептикозных бактерий *Bordetella bronchiseptica* 11
4.1. Морфология 11
4.2. Культуральные свойства 11
4.3. Ферментативные свойства 11
4.4. Серологические свойства 11
4.5. Антигенная структура (серотипы) 12
4.6. Гемолизирующая активность 12
4.7. Дермонекротические свойства 12
4.8. Вирулентность 12
5. Хранение штаммов 13
6. Методы контроля производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий 16

6.1. Морфологические и культуральные свойства 16
6.2. Серологические свойства 17
6.2.1. Развёрнутая реакция агглютинации 17
6.2.2. Реакция агглютинации на стекле 19
6.2.3. Развёрнутая реакция агглютинации с сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 паракоклюшного микроба в пробирках 20
6.2.4. Развёрнутая реакция агглютинации с сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 паракоклюшного микроба (макро- или микрометодом) в планшетах 21
6.3. Определение гемагглютинирующей и гемолизирующей активности 22
6.3.1. Агглютинация эритроцитов 22
6.3.2. Определение гемолизирующей активности 23
6.4. Определение дермонекротических свойств 23
6.5. Методика определения вирулентности при интраназальном заражении 24
6.6. Оценка остаточной токсичности коклюшной вакцины 25
6.6.1. Оценка токсичности коклюшной вакцины в тесте изменения массы тела мышей 25
6.6.2. Оценка остаточного содержания термолабильного (дермонекротического) токсина 26
6.6.3. Оценка лейкоцитозстимулирующей активности 27
6.6.4. Оценка гистаминсенсибилизирующей активности 28
6.7. Методика определения защитных свойств штаммов коклюшных бактерий 29
6.7.1. Определение защитных свойств по выживаемости 30
6.7.2. Определение количества международных защитных единиц (МЗЕ) 32
7. Возможность обновления производственных штаммов 37
Приложение 1. Среда Борде-Жангу 38
Приложение 2. Подсчет $ЛД_{50}$ по методу Кербера 39
Приложение 3. Паспорт на производственный штамм 40
Приложение 4. Таблица, используемая для подсчета $ЕД_{50}$ при оценке активности коклюшной вакцины 42

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
18 января 2008 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий

Методические указания МУК 4.2.2317—08

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к штаммам коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий, используемым в производстве корпускулярного или бесклеточного коклюшного компонента комплексных вакцин, а также диагностическим коклюшным и паракоклюшным препаратам и методам их контроля, условиям приготовления лиофилизированных культур, их хранению.

1.2. Методические указания предназначены для организаций, осуществляющих производственный выпуск препаратов для профилактики и диагностики коклюша и паракоклюша; органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор; учреждений, осуществляющих свою деятельность в целях обеспечения государственного санитарно-эпидемиологического надзора; других органов и организаций, осуществляющих контроль за качеством и безопасностью препаратов для профилактики и диагностики коклюша и паракоклюша.

2. Требования к производственным штаммам коклюшных бактерий *Bordetella pertussis*

Для производства корпускулярного или бесклеточного коклюшного компонента комплексных вакцин и диагностических препаратов используют штаммы *B. pertussis*, отвечающие требованиям, характерным для гладкой формы (фазы I) бактерий. Из каждого изучаемого штамма готовят коклюшную вакцину (КВ), которую характеризуют по всем требуемым параметрам. Коклюшные микробные клетки и КВ, приготовленные из них, должны отвечать следующим требованиям.

2.1. Морфология

Коклюшные бактерии – неподвижные, грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки (коккобактерии), располагающиеся в мазках отдельно или парами, без признаков полиморфизма, размером 0,2—0,3× 0,5—1,0 мкм. Имеют нежную капсулу. Спор не образуют.

2.2. Культуральные свойства

Строгие аэробы, при росте использующие никотиновую кислоту, глутамин и цистеин как источники азота, углерода и энергии. Колонии микробов 1-го пассажа (посев лиофильно высушенной культуры из ампулы) появляются через 3—4 суток.

На среде Борде-Жангу (прилож. 1) колонии мелкие, диаметром от 0,5 до 1,0 мм, выпуклые, круглые, с ровными краями, серого цвета, блестящие (в виде «жемчужин»), полупрозрачные, окружённые нерезко ограниченной зоной гемолиза. На среде КУА (прилож. 1) колонии мелкие, диаметром около 1,0 мм, выпуклые, круглые, с ровными краями, серовато-кремового цвета, блестящие. Культуры не должны расти на мясо-пептонном агаре.

Оптимальная температура выращивания (36,0 ± 0,5) °С.

2.3. Ферментативные свойства

B. pertussis ферментативно малоактивны, сахаров не расщепляют, не обладают протеолитической активностью, не восстанавливают нитратов, продуцируют оксидазу, каталазоположительны, лакмусовое молоко подщелачивают за 12—14 дней (табл. 1).

2.4. Серологические свойства

Сывороткой диагностической коклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) культуры должны агглютинироваться не ниже 3/4 тит-

ра, сывороткой диагностической паракоклюшной (титр не ниже 1 : 16 000) – не выше 1/10 титра.

2.5. Антигенная структура (серотипы)

Для рода *Bordetella* общим (родовым признаком) является наличие агглютиногена 7. Вид pertussis характеризуется обязательным присутствием агглютиногена 1 (видовой признак). Кроме того, в разной комбинации в состав штаммов могут входить агглютиногены: 2, 3, 4, 5, 6, 13 (табл. 2). При изготовлении вакцин необходимо использовать штаммы трёх серотипов (1, 2, 3; 1.2.0; 1.0.3), взятых в равных соотношениях. Культуры должны агглютинироваться соответствующими адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 не ниже 1 : 1 280.

2.6. Гемагглютинирующая и гемолитическая активность

Единичные колонии культур 2—3 пассажа на 1—2 сутки роста в тонком слое (1,5—2,0 мм) среды Борде-Жангу должны быть окружены зоной гемолиза.

Коклюшная суспензия (КС) мутностью 10 МЕ должна агглютинировать эритроциты человека 0 группы крови, куриные или гусиные эритроциты на 2 креста.

2.7. Дермонекротические свойства

При внутрикожном введении кроликам 0,2 мл взвеси, содержащей живую культуру мутностью 1 МЕ, должен образоваться геморрагический некроз размером от 0,5 до 2,0 см в диаметре, у морских свинок – от 0,3 до 1,0 см.

2.8. Вирулентность

Культура должна быть вирулентной для мышей: при интраназальном заражении $ЛД_{50}$ должна быть в пределах 10—200 млн микробных клеток, а при внутримозговом заражении – не выше 25 млн микробных клеток.

Примечание.

Мутность микробной взвеси определяют в сравнении с ОСО мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-85—05), который откалиброван по международному стандартному образцу. 1 МЕ (международная единица мутности) условно соответствует 1 млрд коклюшных бактерий.

2.9. Токсичность

КВ, приготовленная из обезвреженных формальдегидом культур одного штамма, содержащая мертиолят (100 ± 20) мкг/мл, должна обладать низкой токсичностью.

Определение остаточной токсичности

2.9.1. В тесте изменения массы тела мышей по методу, рекомендованному ВОЗ. При внутрибрюшинном введении КВ в объеме 0,5 мл, содержащем 10^{10} микробных клеток, все животные должны быть живы в течение срока наблюдения.

а) Через 72 часа групповая масса тела мышей должна быть не ниже их массы тела перед введением препарата.

б) Через 7 суток наблюдения относительный прирост массы тела мышей, получивших испытуемую вакцину, должен составлять не менее 60 % прироста массы тела контрольных мышей и не менее абсолютного и относительного прироста массы тела мышей, получивших отраслевой стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины ОСО 42-28-89-01П.

в) Относительный прирост массы тела мышей, получивших ОСО 42-28-89-01П, должен соответствовать установленному показателю.

Если при проведении опыта одно из указанных условий нарушается, опыт повторяют на удвоенном количестве животных при тех же условиях учёта опыта. Допускается гибель не более 5 % от общего числа животных.

2.9.2. По лейкоцитозстимулирующей активности (ЛСА). КВ в объеме 0,5 мл, содержащем 10^{10} микробных клеток, вводят мышам внутрибрюшинно. Вакцину следует считать слаботоксичной, если индекс ЛСА по отношению к ОСО 42-28-89-01П составляет 0,5 и меньше; средней токсичности, если индекс ЛСА находится в пределах от 0,5 до 1,0; с выраженной токсичностью, если индекс ЛСА более 1,0. Для производства коклюшного компонента вакцин штаммы с выраженной токсичностью использовать нельзя.

2.9.3. По гистаминсенсибилизирующей активности (ГСА). Разные дозы КВ вводят внутрибрюшинно. КВ следует считать слаботоксичной, если индекс ГСА по отношению к отраслевому стандартному образцу гистаминсенсибилизирующей активности коклюшной вакцины ОСО 42-28-87-02П будет равен 0,5 или меньше; среднетоксичной, если индекс ГСА будет находиться в пределах от 0,5 до 1,0; и с выраженными гистаминсенсибилизирующими свойствами, если индекс ГСА будет 1,0

и более. Для производства коклюшного компонента вакцин штаммы с выраженной токсичностью использовать нельзя.

2.9.4. По остаточному содержанию термолабильного (дермонекротического) токсина (ТЛТ). Определяют при подкожном введении испытуемых КВ в затылочную область мышей-сосунков или при внутрикожном введении белокожим кроликам породы шиншилла.

КВ не должна вызывать изменения кожных покровов у мышей-сосунков.

КВ не должна вызывать у кроликов некроз. Допускается гиперемия диаметром не более 10 мм. На месте введения живой культуры должен определяться некроз размером не менее 5 мм в диаметре (контроль чувствительности кроликов к коклюшному токсину).

2.10. Защитные свойства

КВ при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозе, содержащей микробные клетки в концентрации $0{,}75 \cdot 10^9$, должна обеспечивать выживаемость при последующем заражении вирулентным штаммом *B. pertussis* № 18323 не менее 70 % животных.

Суспензия мутностью 20 МЕ должна содержать не менее 10 международных защитных единиц (МЗЕ).

Примечание:

При использовании штаммов коклюшных бактерий только в производстве диагностических препаратов (сывороток, диагностикумов) защитные свойства не проверяют.

3. Требования к производственным штаммам паракоклюшных бактерий *Bordetella parapertussis*

3.1. Морфология

Паракоклюшные бактерии морфологически подобны коклюшным бактериям. Это неподвижные, грамотрицательные, мелкие палочки, располагающиеся в мазках отдельно или парами, иногда в виде коротких цепочек, без признаков диссоциации, размером от 0,6 до 2,0 мкм. Спор не образуют.

3.2. Культуральные свойства

Строгие аэробы, использующие, как и коклюшные бактерии, для своего роста аминокислоты. На среде Борде-Жангу на 1—2 сутки образуют колонии выпуклые с ровными краями, серого цвета, блестящие, напоминающие капельки ртути, полупрозрачные, диаметром до 1,2 мм,

окруженные зоной гемолиза. На среде КУА колонии выпуклые с ровными краями серовато-кремового цвета, диаметром до 1,5 мм.

Паракоклюшные бактерии менее прихотливы к питательным средам: могут расти на пептонном агаре. Оптимальная температура для роста – (35,5 ± 1) °С.

3.3. Ферментативные свойства

Паракоклюшные бактерии продуцируют тирозиназу, вызывая побурение питательной среды, содержащей кровь, уреазу, вызывая расщепление мочевины; утилизируют цитраты; каталазоположительны; подщелачивают лакмусовое молоко за 1—4 дня. Паракоклюшные бактерии не разлагают углеводы, не разжижают желатин (табл. 1).

3.4. Серологические свойства

Сывороткой диагностической паракоклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) культуры должны агглютинироваться не ниже 3/4 титра, сывороткой диагностической коклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) – не выше 1/10 титра.

3.5. Антигенная структура (серотипы)

Агглютиноген 7 является родовым признаком. Видовой признак *B. parapertussis* характеризуется присутствием агглютиногена 14. Разные штаммы паракоклюшных бактерий могут отличаться между собой по содержанию типовых агглютиногенов 8, 9, 10 (табл. 2).

3.6. Гемагглютинирующая и гемолитическая активность

Паракоклюшные бактерии при росте на среде Борде-Жангу вызывают гемолиз эритроцитов. При равных условиях культивирования паракоклюшная палочка, в сравнении с коклюшной, вызывает более сильный гемолиз.

Паракоклюшная суспензия мутностью 10 МЕ должна агглютинировать эритроциты человека 0 группы крови, куриные или гусиные эритроциты на 2 креста.

3.7. Дермонекротические свойства

При внутрикожном введении кроликам 0,2 мл взвеси, содержащей живую культуру мутностью 1 МЕ, должен выявляться геморрагический некроз размером от 0,5 до 1,5 см.

3.8. Вирулентность

Проверяют в случае разработки паракоклюшной вакцины. При интраназальном заражении мышей, массой тела 12—14 г, LD_{50} должна быть не выше 200 млн микробных клеток.

4. Требования к производственным штаммам бронхисептикозных бактерий Bordetella bronchiseptica

Штаммы бронхисептикозных бактерий используют при производстве сывороток диагностических коклюшных к агглютиногенам 1, 2, 3 и паракоклюшных к агглютиногену 14, адсорбированных, для реакции агглютинации (РА), сухих.

4.1. Морфология

Строгие аэробы, требующие, как и коклюшные бактерии, для роста аминокислоты. Бронхисептикозные бактерии – подвижные (обладают жгутиками), грамотрицательные, мелкие палочки, по размерам неотличимы от коклюшного микроба, располагающиеся в мазках отдельно или в виде короткой цепочки. Спор не образуют.

4.2. Культуральные свойства

На среде Борде-Жангу через 24—48 ч образуют колонии мелкие, диаметром до 1 мм, круглые, с ровными краями, при первичном посеве не отличимы от колоний коклюшного микроба окружены зоной гемолиза. На среде КУА через 24 ч образуют колонии до 1,2 мм, серые, круглые, с ровными краями, микроб растет в виде очень мелких выпуклых колоний серого цвета. Культура может расти на пептонном агаре, на 5 % желчи. Оптимальная температура для роста – (35,5 ± 1) °С.

4.3. Ферментативные свойства

Бронхисептикозные бактерии не разлагают углеводы, не разжижают желатин, подщелачивают лакмусовое молоко за 1—4 дня; продуцируют каталазу, уреазу, оксидазу; восстанавливают нитраты в нитриты, утилизируют цитраты.

4.4. Серологические свойства

Бронхисептикозной сывороткой (титр не ниже 1 : 16 000) должны агглютинироваться не ниже $^{3}/_{4}$ титра, коклюшной или паракоклюшной сыворотокой (титр не ниже 1 : 16 000) – не выше $^{1}/_{10}$ титра.

4.5. Антигенная структура (серотипы)

Родовой признак – наличие агглютиногена 7, видовой признак – агглютиногена 12. Разные штаммы бронхисептикозных бактерий могут отличаться между собой по содержанию типовых агглютиногенов 8, 9, 10, 11, 13 (табл. 2).

4.6. Гемолизирующая активность

Единичные колонии культур 2—3 пассажа на 1—2 сутки роста в тонком слое (1,5—2,0 мм) среды Борде-Жангу должны быть окружены зоной гемолиза.

4.7. Дермонекротические свойства

При внутрикожном введении кроликам 0,2 мл взвеси, содержащей живую культуру мутностью 1 МЕ, должен образоваться геморрагический некроз размером от 0,5 до 2,0 см в диаметре, у морских свинок – от 0,3 до 1,0 см.

4.8. Вирулентность

Для изготовления диагностических препаратов не определяют.

Характеристика штаммов *Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica* приведена в табл. 1 и 2*.

Таблица 1

Дифференциальные признаки различных видов бордетелл

Свойства	B. pertussis	B. parapertussis	B. bronchiseptica
Подвижность	–	–	+
Рост на среде Борде-Жангу:			
1—2 дня	–	+	+
3—6 дней	+	+	+
Рост на пептоном агаре:			
фаза I	–	+	+
фаза IV	+	+	+
Побурение	–	+	–
Рост на агаре Мас-Conkey	–	+	+
Утилизация цитратов	–	+	+
Восстановление нитратов	–	–	+[a]
Уреаза	–	+	+[b]
Оксидаза	+	–	+

Символы: + – свойственно виду; – – не свойственно виду.

* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.1.

а – положительно в нитратной среде с добавлением никотинамид аденин динуклеотида (NAD).

б – положительна в течение 4 ч.

Таблица 2

Антигенная структура бактерий рода Bordetella фазы 1

Антигены	B. pertussis	B. parapertussis	B. bronchiseptica
К-антигены			
Общий для рода:			
агглютиноген 7	+	+	+
Специфичные для видов:			
агглютиноген 1	+	–	–
агглютиноген 14	–	+	–
агглютиноген 12	–	–	+
Другие факторы, встречающиеся в одном или более штаммах:			
агглютиногены 2, 3, 4, 5, 6, 13	+	–	–
агглютиногены 8, 9, 10	–	+	–
агглютиногены 8, 9, 10, 11, 13	–	–	+
О-антиген, общий	+	+	+
Филаментозный гемагглютинин	+	+	+
Токсины:			
ТЛТ	+	+	+
Коклюшный токсин	+	–	–
ЛПС	+	+	+

5. Хранение штаммов

Производственные штаммы, аттестованные во ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича, хранят в лиофилизированном состоянии при температуре (5 ± 3) °С. На этикетке каждой ампулы должно быть указано: наименование (род, вид), номер штамма или особое название штамма, дата и порядковый номер лиофилизации (высушивания). Продолжительность хранения высушенных штаммов не должна превышать 10 лет. Ежегодно, перед использованием в производстве, штаммы должны быть проверены по всем требуемым показателям. Протоколы их контроля должны быть представлены в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в установленный срок и храниться в специализированной лаборатории.

Свежевыделенные и производственные штаммы рекомендуется высушивать на стерильном обезжиренном молоке или растворе, содержащем 10 % сахарозы и 1 % желатина в воде (сахарозо-желатиновая среда – СЖ). Свежевыделенные штаммы должны быть высушены в пределах

3-х месяцев от момента выделения (5—6 пересевов) после проверки всех основных свойств, указанных в разделе 1.

Производственные штаммы рекомендуется высушивать из 3—4 пересева после восстановления их из лиофильно высушенного состояния. В асептических условиях ампулу с сухой культурой обрабатывают 96 %-м спиртом этиловым, протирают сухой стерильной безворсовой тканью, вскрывают под защитой пламени спиртовки и стерильной пипеткой вносят в нее 0,2—0,3 мл 0,9 %-го стерильного раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2. Полученную взвесь в объеме по 0,1 мл переносят в чашки Петри со средой Борде-Жангу с 30 % крови. Пастеровской пипеткой с запаянным концом культуру в чашках Петри штрихом рассевают по поверхности среды для получения отдельных колоний. Для синхронизации роста культуры, засеянные чашки Петри выдерживают от 18 до 20 ч при температуре (5 ± 3) °С. Затем чашки помещают в термостат при (35,5 ± 0,5) °С. Для создания влажной атмосферы в термостат помещают открытую емкость со стерильной дистиллированной водой. Через 48—72 ч под микроскопом-лупой (окуляр 8) проверяют морфологию выросшей культуры. Если более 80 % выросших колоний соответствуют требованиям типичных колоний (мелкие, круглые, гладкие, выпуклые, почти прозрачные, дающие под микроскопом при боковом освещении острый лучик), то отбирают 10—15 таких колоний. Отобранные колонии засевают на пробирки со средой Борде-Жангу с 30 % крови. Пробирки с культурой помещают в термостат при температуре (35,5 ± 0,5) °С. Через 40—48 ч из выросшей культуры готовят мазки, которые окрашивают по Граму. Отконтролированную по морфологии и бактериоскопической чистоте коклюшную культуру пересевают на 15—20 пробирок со средой Борде-Жангу с 30 % крови и инкубируют 24—36 ч при температуре (35,5 ± 0,5) °С и повышенном содержании влаги. После очередной проверки культуры на чистоту и морфологическую однородность чистую типичную культуру с поверхности питательной среды снимают запаянной пастеровской пипеткой и переносят на стенку пробирки со средой СЖ. Культуру, при помощи той же запаянной пастеровской пипетки, растирают на стенке пробирки, постепенно смывая средой СЖ, суспендируют пастеровской пипеткой. Пробирку со смытой культурой помещают в емкость с водой, в которой находятся куски льда. Полученную микробную взвесь из пробирок объединяют в стерильную колбу, вместимостью 0,1 л, перемешивают пастеровской пипеткой, и колбу помещают в емкость с водой и льдом. Определяют мутность приготовленной суспензии и не позднее, чем через 1 ч после начала смыва, суспензию (не менее 30 МЕ/мл) из колбы стерильной пастеровской пипеткой раз-

ливают по 0,2—0,25 мл в подготовленные стерильные вакуумные ампулы. Стерильность микробной суспензии проверяют до и после розлива путём высева 0,5—1,0 мл на тиогликолевую среду.

Если требованиям типичных колоний соответствуют менее 80 % выросших колоний, то необходимо дополнительно провести селекцию штамма. С этой целью необходимо под микроскопом-лупой отобрать 10—15 типичных колоний. Каждую колонию засеять штрихом на чашки Петри со средой Борде-Жангу с 30 % крови (5—6 колоний на 1 чашку). Чашки с культурой поместить в термостат при температуре (35,5 ± 0,5) °С на 18—24 ч. Через 18—24 ч определить активность выросшей культуры в реакции агглютинации на стекле с адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3. Для дальнейшего исследования отбирают культуру, которая дает агглютинацию на стекле на 3 креста. Отобранную культуру пересевают на среду БЖ с 30 % крови или КУА с 5 % крови, затем ее проверяют в развернутой реакции агглютинации с агглютинирующей сывороткой к агглютиногенам 1, 2, 3. Культура, агглютинирующаяся типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 в разведении 1 :1 280 и выше, используется для лиофильной сушки как указано выше. Если культура агглютинируется сывороткой в более низких разведениях, то процедуру селекции необходимо повторить.

Разлитую партию ампул замораживают и высушивают одновременно. В журнале лиофилизации штаммов *Bordetella pertussis* регистрируют: название культуры, номер штамма или его особое название, количество разлитых ампул, дату розлива, дату замораживания, дату лиофилизации, дату отпайки, количество разлитых ампул, количество лиофилизированных ампул, количество забракованных ампул с высушенной культурой, фамилии и подписи исполнителей и ответственного лица. Качество запайки и наличие вакуума в ампулах проверяют на аппарате д'Арсонваля или Тесла. Остаточная влажность лиофилизата не должна превышать 3 %.

Каждую серию лиофилизированной культуры проверяют на выживаемость, отсутствие контаминации посторонней микрофлорой, затем по всем иммунобиологическим свойствам, указанным в разделе 1. Для контроля используют коклюшную культуру 2—3 пассажа. Результаты контроля фиксируют в журнале проверки штаммов. Лиофилизированную культуру регистрируют в инвентарном журнале коллекционных штаммов *Bordetella pertussis*.

Примечание:

1-ый пассаж – культура, выращенная при посеве из ампулы.

Журналы, в которых производят регистрацию штаммов до и после высушивания, а также фиксируют данные контроля их биологических свойств, должны быть прошнурованы и скреплены печатью. Копии протоколов контроля штаммов следует ежегодно направлять в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

За состояние штаммов несёт ответственность производственная лаборатория.

Использование ампул с культурой данного номера лиофилизации для производственных целей допускается только после окончательной проверки ее по всем свойствам.

После восстановления культуру поддерживают пересевом каждые 7—10 дней на пробирках со средой Борде-Жангу с 30 % крови или КУА с 5 % крови. На питательных средах культуру хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 10 дней. Для производственных посевов используют не более 3—4 пересевов с момента восстановления культуры из высушенного состояния.

Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов регламентируется действующими нормативными документами.

6. Методы контроля производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий

6.1. Морфологические и культуральные свойства

Для определения морфологических и культуральных свойств производят высев культур штрихом для получения изолированных колоний на чашки Петри со средой КУА, содержащей 5 % крови или Борде-Жангу, содержащей 30 % крови. Параллельно сеют на чашки Петри с данными средами, разлитыми тонким слоем (1,5—2,0 мм) для оценки гемолитических свойств штаммов.

Засеянную культуру на среде Борде-Жангу или КУА инкубируют в термостате при температуре (35,5 ± 0,5) °С при повышенном содержании влаги. Рост культуры просматривают через 48—72 ч (*B. pertussis*) или через 24—48 ч (*B. parapertussis и B. bronchiseptica*). Проверяют морфологию колоний под микроскопом-лупой МБС. Для дальнейшей работы следует отбирать мелкие, круглые, выпуклые, почти прозрачные колонии, отражающие при косом освещении острый лучик света. Контроль морфологии культуры проводят путём микроскопирования препаратов, окрашенных по Граму.

6.2. Серологические свойства

6.2.1. Развёрнутая реакция агглютинации

Для серологической оценки коклюшной и паракоклюшной культур используют сыворотки производства Государственного учреждения НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (филиал «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН): сыворотка диагностическая коклюшная поливалентная для реакции агглютинации (РА), сухая; сыворотка диагностическая паракоклюшная поливалентная для реакции агглютинации (РА), сухая; сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам 1, 2, 3 и паракоклюшные к агглютиногену 14, адсорбированные, для реакции агглютинации (РА), сухие или другие, аналогичные вышеуказанным.

Сывороткой диагностической коклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) коклюшные культуры должны агглютинироваться не ниже $^{3}/_{4}$ титра, сывороткой диагностической паракоклюшной (титр не ниже 1 : 16 000) – не выше $^{1}/_{10}$ титра.

Сывороткой диагностической паракоклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) паракоклюшные культуры должны агглютинироваться не ниже $^{3}/_{4}$ титра, сывороткой диагностической коклюшной поливалентной (титр не ниже 1 : 16 000) – не выше $^{1}/_{10}$ титра.

Реакцию агглютинации проводят с культурой 2—3 пассажа, выращенной на среде Борде-Жангу или КУА в течение 48 ч (коклюшная), 24 ч (паракоклюшная и бронхисептикозная). Со среды Борде-Жангу культуру снимают платиновой или стеклянной петлёй, сделанной из пастеровской пипетки, со среды КУА смывают небольшим количеством 0,9 %-го раствора натрия хлорида и суспендируют в 0,9 %-м растворе натрия хлорида. Взвесь должна быть гомогенной (зернистость указывает на диссоциацию штамма). Мутность взвеси доводят до 10 ME.

В 2 ампулы с сухим препаратом сыворотки диагностической коклюшной поливалентной или сыворотки диагностической паракоклюшной поливалентной вносят в каждую по 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2. Содержимое ампул аккуратно перемешивают пастеровской пипеткой до полного растворения сыворотки и объединяют. В результате получают 2 мл цельной сыворотки (пробирка № 1). Из пробирки № 1 отбирают 1 мл сыворотки, добавляют 4 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2, получают разведение 1 : 5 (пробирка № 2); к 1 мл сыворотки с разведением 1 : 5 добавляют 9 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 для получения разведения 1 : 50 (пробирка

№ 3); из пробирки № 3 отбирают 1 мл сыворотки, добавляют к нему 9 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 – в результате получают разведение 1 : 500 (пробирка № 4). Для постановки развернутой РА готовят двукратные разведения сыворотки от 1 : 500 до 1 : 128 000.

В ряд пробирок, за исключением первой, наливают по 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2. Затем в первую и вторую пробирки вносят по 0,5 мл разведения сыворотки 1 : 500. После тщательного перемешивания содержимого второй пробирки, 0,5 мл полученного разведения 1 : 1 000 переносят в третью, где получают разведение 1 : 2 000, из третьей в четвертую и т. д. Из последней пробирки ряда, содержащей предельное разведение сыворотки, 0,5 мл жидкости удаляют для сохранения общего объема.

В ряд агглютинационных пробирок, содержащих по 0,5 мл различных разведений сыворотки, вносят микробную взвесь в равном объёме с концентрацией 10 млрд м.кл/мл. Одновременно проводят контроль сыворотки и микробной взвеси в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации: сыворотка в разведении 1 : 50 с 0,9 %-м раствором натрия хлорида, pH 7,1 ± 0,2; микробная взвесь с 0,9 %-м раствором натрия хлорида. Смесь хорошо встряхивают и помещают в термостат на 2 ч при (37 ± 1) °С, а затем оставляют до следующего дня при комнатной температуре (20 ± 2) °С. Результаты реакции агглютинации через 20—24 ч учитывают визуально до встряхивания пробирок, а затем для более точного учета – в агглютиноскопе при осторожном встряхивании осадка путем медленного наклона пробирки. При положительной реакции осадок покрывает все дно пробирки в виде зонтика. Титр – последнее удвоенное разведение сыворотки, дающее агглютинацию на 3+, выраженное обратной величиной.

Учет реакции:

++++ – полная агглютинация – большой плотный осадок, четко виден зонтик, полное просветление надосадочной жидкости, после легкого встряхивания – крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;

+++ – осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость еще прозрачна, слегка опалесцирует, после легкого встряхивания – средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;

++ – мелкие, нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна, после легкого встряхивания – мелкие, нестойкие хлопья;

+ – следы агглютинации – в центре небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачная;

– – отрицательная реакция – осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

Оценка контрольных реакций:

• сыворотка должна быть прозрачной, без осадка;

• микробная суспензия с 0,9 %-м раствором натрия хлорида – осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

6.2.2. Реакция агглютинации на стекле

Для дифференциальной диагностики видов рода *Bordetella* могут быть использованы гипериммунные сыворотки. Гипериммунные сыворотки с титром 1 : 16 000 разводят до 1 : 200, с титром 1 : 32 000— 1 : 400. Около капли сыворотки размещают культуру, которую растирают до гомогенного состояния. Реакция агглютинации на стекле является ориентировочным показателем, после которого, при необходимости, проводят развернутую реакцию агглютинации.

Для определения серотипового состава культуры используют сыворотки диагностические коклюшные к агглютиногенам 1, 2, 3 и паракоклюшные к агглютиногену 14, адсорбированные, для реакции агглютинации (РА), сухие.

В ампулу с сухими адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 добавляют 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 для получения разведения 1 : 10 (с учетом исходного разведения сыворотки при адсорбции в 5 раз). В ампулу с сухой адсорбированной типоспецифической сывороткой к паракоклюшному агглютиногену 14 добавляют 0,1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 для получения разведения сыворотки 1 : 10 (с учетом исходного разведения сыворотки при адсорбции в 10 раз). Содержимое ампулы несколько раз перемешивают пипеткой до однородного состояния и для постановки РА на предметном стекле переносят 0,5 мл сыворотки в пробирку, содержащую 0,75 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 для получения разведения 1 : 25. Далее сыворотку разводят тем же раствором двукратно до 1 : 200—1 : 400.

На обезжиренное предметное стекло в каплю разведенной сыворотки вносят 2-х суточную культуру мутностью 50 МЕ. Капли на стекле соединяют путем легкого покачивания, которое продолжают до окончания наблюдения.

Контролем служит капля взвеси штамма, внесенная в каплю 0,9 %-го раствора натрия хлорида.

Учёт реакции визуально:

+++ – быстрое образование больших хлопьев, полное завершение агглютинации в пределах 3-х мин;

++ – полное завершение агглютинации в течение 5 мин;

+ – медленное образование мелких хлопьев, неполное завершение агглютинации в течение 5 мин;

– – отсутствие агглютинации в течение 5 мин.

Микробная суспензия с 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 не должна давать агглютинации.

Все штаммы, давшие отрицательные результаты, считаются условно не содержащими агглютиногены.

6.2.3. Развёрнутая реакция агглютинации с сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 паракоклюшного микроба в пробирках

Коклюшные культуры должны агглютинироваться соответствующими адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 не ниже 1 : 1 280.

В ампулу с сухими адсорбированными типоспецифическими сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 добавляют 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, pH 7,1 ± 0,2, для получения разведения 1 : 10 (с учетом исходного разведения сыворотки при адсорбции в 5 раз). В ампулу с сухой адсорбированной типоспецифической сывороткой к паракоклюшному агглютиногену 14 добавляют 0,1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2, для получения разведения сыворотки 1 : 10 (с учетом исходного разведения сыворотки при адсорбции в 10 раз). Содержимое ампулы несколько раз перемешивают пипеткой до однородного состояния.

Для постановки развернутой РА готовят двукратные разведения сыворотки от 1 : 10 до 1 : 5 120 на 0,9 %-м растворе натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 .

В ряд пробирок, за исключением первой, наливают 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2. Затем в первую и вторую пробирки вносят по 0,5 мл разведения сыворотки 1 : 10. После тщательного перемешивания содержимого второй пробирки 0,5 мл полученного разведения 1 : 20 переносят в третью, где получают разведение 1 : 40, из третьей в четвертую и т. д. Из последней пробирки ряда, содержащей предельное разведение сыворотки, 0,5 мл жидкости удаляют для сохранения общего объема.

В ряд агглютинационных пробирок с двукратными разведениями сыворотки в объеме 0,5 мл вносят равный объем микробной взвеси с мутностью 10 МЕ. Одновременно проводят контроль сыворотки и антигена в тех же объемах на отсутствие спонтанной агглютинации:

• сыворотка в разведении 1 : 10 с 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2 ;

• микробная взвесь с 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2.

Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания штатива. Затем штатив помещают на 2 ч в термостат при температуре (36 ± 1) °С, после чего оставляют на 18—20 ч при температуре от (5 ± 3) °С.

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально до встряхивания пробирок, а затем для более точного учета – в агглютиноскопе при осторожном встряхивании осадка путем медленного наклона пробирки.

Учет реакции:

++++ – полная агглютинация – большой плотный осадок, четко виден зонтик, полное просветление надосадочной жидкости, после легкого встряхивания – крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;

+++ – осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость еще прозрачна, слегка опалесцирует, после легкого встряхивания – средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;

++ – мелкие, нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна, после легкого встряхивания – мелкие, нестойкие хлопья;

+ – следы агглютинации – в центре небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачная;

– – отрицательная реакция – осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

6.2.4. Развёрнутая реакция агглютинации с сыворотками к агглютиногенам 1, 2, 3 коклюшного микроба и 14 паракоклюшного микроба (макро- или микрометодом) в планшетах

Каждую сыворотку разводят двукратно 0,9 %-м раствором натрия хлорида (pH 7,0 ± 0,2), начиная с разведения 1 : 10 до 1 : 10 240—1 : 20 480. Разведения сывороток в объёме 0,1—0,2 мл или 0,025—0,05 мл вносят в полистироловые пластины и к ним добавляют равный объём коклюшной или паракоклюшной суспензии мутностью 10 МЕ или 20 МЕ микробных клеток в 1 мл. Пластины встряхивают в шуттель-

аппарате в течение 5 мин при комнатной температуре (20 ± 2) °С, а затем выдерживают в течение 20 мин в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С. При отсутствии шуттель-аппарата содержимое лунок перемешивают встряхиванием пластин (постукивая кончиками пальцев с разных сторон пластины) в течение 5 мин, а затем пластины помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 2—2,5 ч. При необходимости пластины выдерживают дополнительно при комнатной температуре до получения четкой реакции в контрольных лунках.

Учёт реакции в обоих случаях при отрицательном ответе в контрольных лунках проводят с помощью лупы МБС-I. Титр – последнее удвоенное разведение сыворотки, дающее агглютинацию на 2+, выраженное обратной величиной.

6.3. Определение гемагглютинирующей и гемолизирующей активности

Коклюшная и паракоклюшные суспензии мутностью 10 МЕ должны агглютинировать эритроциты человека 0 группы крови, куриные или гусиные эритроциты не менее чем на 2 креста.

6.3.1. Агглютинация эритроцитов

Суспензию готовят из 48-часовой культуры 2 или 3 пассажа, выращенной на среде Борде-Жангу или КУА. Из суспензии мутностью 20 МЕ/мл делают двукратные разведения, которые в объёме 0,25—0,5 мл (макрометод) или 0,025—0,05 мл (микрометод) вносят в полистироловые пластины. Затем к ним добавляют равный объём 0,5 % или 0,1—0,2 % взвеси куриных, гусиных эритроцитов или эритроцитов человека 0 группы крови. Смесь встряхивают и оставляют на 2—2,5 ч при комнатной температуре (20 ± 2) °С. В качестве контроля используют взвесь эритроцитов, добавленную к равному объёму физиологического раствора. Титр – последнее разведение суспензии, которое агглютинирует эритроциты на 2+. В контрольных лунках не должно быть склеивания эритроцитов.

При отборе штамма для производства выбирают колонии, агглютинирующие эритроциты на 4 креста при предварительном испытании на стекле (1 капля 0,5 % взвеси эритроцитов соединяют с 1 каплей микробной взвеси, приготовленной из посевов колоний на сектора).

6.3.2. Определение гемолизирующей активности

Единичные колонии культур 2—3 пассажа рода *Bordetella* на 1—2 сутки роста в тонком слое (1,5—2,0 мм) среды Борде-Жангу должны быть окружены зоной гемолиза.

Культуру 2—3 пассажа засевают штрихом на среду Борде-Жангу, содержащую 10—30 % крови, разлитую тонким слоем на чашки Петри, инкубируют в термостате при температуре (36 ± 0,5) °С в течение 48—72 ч (коклюшный микроб) или 24 ч (паракоклюшный и бронхисептикозный микроб). Гемолизирующую активность штаммов определяют ежедневно. При селекции единичных колоний необходимо отбирать колонии с зоной интенсивного гемолиза (1,5—2 мм) на 1—2-е сутки роста.

6.4. Определение дермонекротических свойств

Коклюшная и бронхисептикозная микробная суспензия, содержащая 1 МЕ в объёме 0,2 мл должна вызывать у кроликов геморрагический некроз размером от 0,5 до 2 см в диаметре, у морских свинок – от 0,3 до 1,0 см, паракоклюшная микробная суспензия той же мутности у кроликов должна вызывать геморрагический некроз размером от 0,5 до 1,5 см.

48-часовую культуру коклюшного микроба или 24-часовую культуру паракоклюшного (бронхисептикозного) микроба 2-го или 3-го пассажа, выращенную на среде Борде-Жангу или КУА смывают физиологическим раствором и разводят с таким расчётом, чтобы опытная доза содержалась в объёме 0,2 мл. Несколько разведений суспензии (не менее 3-х разведений мутностью: 2 МЕ, 1 МЕ, 0,5 МЕ) вводят внутрикожно двум белокожим кроликам породы шиншилла массой 1,5—2,5 кг или морским свинкам массой 300—400 г в объёме 0,2 мл. Результат учитывают через 48—96 ч. Коклюшная и бронхисептикозная микробная суспензия, содержащая 1 МЕ в объёме 0,2 мл должна вызывать у кроликов гемморагический некроз размером от 0,5 до 2 см в диаметре, у морских свинок – от 0,3 до 1,0 см, паракоклюшная микробная суспензия той же мутности у кроликов должна вызывать геморрагический некроз размером от 0,5 до 2 см. Следует иметь в виду, что вследствие неодинаковой чувствительности некоторые кролики могут не давать характерной реакции. В таком случае опыт необходимо повторить на том же количестве животных.

6.5. Методика определения вирулентности при интраназальном заражении

Коклюшная культура должна быть вирулентной для мышей: при интраназальном заражении $ЛД_{50}$ должна быть в пределах 10—200 млн микробных клеток, а при внутримозговом заражении – не выше 25 млн микробных клеток; для паракоклюшной культуры LD_{50} должна быть не выше 200 млн микробных клеток.

Суспензию готовят из 48-часовой коклюшной или 24-часовой паракоклюшной культуры 2 или 3 пассажа, выращенной на среде Борде-Жангу или КУА. Из исходной суспензии делают несколько разведений (кратные 2 или 5), например: 200, 100, 50 и 25 млн, с таким расчётом, чтобы опытная доза содержалась в объеме 0,05 мл. Из каждого разведения суспензии заражают по 5—6 мышей. Заражение мышей производят под лёгким оглушающим наркозом. Для наркоза применяют смесь 2-х частей эфира (для наркоза) с одной частью хлороформа (для наркоза). В стеклянную банку на дно кладут вату, смоченную указанной смесью, и сверху накрывают слоем сухой ваты, затем в банку помещают мышь. Как только мышь, после периода возбуждения, засыпает и не реагирует на покачивание банки, её вынимают из банки, и, держа в левой руке двумя пальцами за шейную складку, вводят суспензию в нос шприцем с тонкой иглой, поднесённой непосредственно к ноздре (сначала к одной, а затем к другой).

Примечание.

Здесь и далее для заражения мышей опытной дозой используют 0,5 или 1,0 мл шприцы с ценой деления 0,01 мл и абсолютной погрешностью измерения дозы ± 0,005 мл.

При этом дыхание мыши должно быть ровным, тогда суспензия без разбрызгивания легко втягивается в нос. Гибели мышей в период заражения быть не должно. После заражения за мышами наблюдают в течение 14 сут. Гибель животных учитывают ежедневно. Мыши, погибшие в первые три дня после заражения, при подсчёте $ЛД_{50}$ исключаются (неспецифическая гибель). Всех погибших мышей вскрывают для определения характерных макроскопических изменений в лёгких (очаговое или полное красное опеченение лёгких). Специфическая гибель подтверждается выделением коклюшных микробов из лёгких. Для посева лёгкие растирают в стерильной баночке с бусами или со стерильным песком и суспензию засевают на чашки со средой Борде-Жангу или КУА. Для вычисления $ЛД_{50}$ применяют метод Кербера или метод пробит-анализа (прилож. 2).

6.6. Оценка остаточной токсичности коклюшной вакцины

Для оценки остаточной токсичности, лейкоцитозстимулирущей, гистамин-сенсибилизирующей и иммуногенной (защитной) активностей из каждого штамма готовят коклюшную вакцину (КВ). Культуру выращивают на среде КУА в течение 36—48 ч, смывают 0,9 %-м раствором хлорида натрия, мутность взвеси доводят до 80—100 МЕ в 1 мл и добавляют формалин до концентрации 0,1 %. Взвесь встряхивают в течение 20—25 мин и оставляют при комнатной температуре (20 ± 2) °С на 22—24 ч. Затем суспензию доводят до мутности 40—60 МЕ в 1 мл, после чего добавляют мертиолят до конечной концентрации (100 ± 20) мкг в 1 мл. Суспензию встряхивают в течение 10 мин и помещают в холодильник при температуре (5 ± 3) °С. Через 7 сут. из суспензии берут пробы для контроля специфической стерильности (не должно быть роста на среде Борде-Жангу или КУА).

Токсические свойства формалинизированной коклюшной вакцины проверяют через 3 месяца после обезвреживания.

6.6.1. Оценка токсичности коклюшной вакцины в тесте изменения массы тела мышей

6.6.1.1. Подготовка к применению ОСО 42-28-89-01П и испытуемых КВ.

Токсичность КВ, приготовленной из штамма, проверяют в сравнении с ОСО 42-28-89-01П коклюшной вакцины. Содержимое двух ампул ОСО растворяют в 6 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2. Для этого в каждую ампулу добавляют 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. После полного растворения таблетки (1—2 мин) содержимое тщательно отбирают тонкой пастеровской пипеткой в небольшой флакон (10 мл). Затем в каждую ампулу снова (2 раза) вносят по 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, тщательно отбирают той же пипеткой содержимое ампул и переносят в тот же флакон. Полученное рабочее разведение содержит в 1 мл 20 МЕ коклюшных бактерий.

Испытуемую КВ предварительно проверяют визуально по физическим свойствам и доводят её мутность до 20 МЕ в 1 мл.

6.6.1.2. Условия и порядок применения.

Для оценки токсичности коклюшной вакцины в тесте изменения массы тела мышей используют животных, равномерно прибавляющих массу тела в течение 3—4 сут. наблюдения. Ежесуточный прирост массы тела мышей должен быть от 0,5 до 1 г.

Группы из 10 белых мышей, где каждая особь имеет массу (15 ± 1) г, должны иметь свободный доступ к воде и пище не менее, чем за 2 ч до инъекции. Групповую массу тела мышей определяют непосредственно перед введением препарата. Каждой мыши вводят внутрибрюшинно испытуемую вакцину или ОСО 42-28-89-01П в объёме 0,5 мл (10 МЕ) шприцем вместимостью 1 мл с иглой № 0625-1. Контрольные животные получают внутрибрюшинно по 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2. За животными наблюдают в течение 7 сут. Групповую массу определяют через 72 ч и через 7 сут. после инъекции.

6.6.1.3. Оценка результатов.

Рассчитывают абсолютный и относительный прирост массы тела мышей. Абсолютный прирост массы тела мышей – разница массы тела мышей на 7 сут. после введения препарата по сравнению с первоначальным (до введения). Относительный прирост массы тела мышей – отношение массы тела мышей, получивших вакцину, к массе тела контрольных животных или животных, получивших ОСО 42-28-89-01П, выраженное в процентах.

6.6.1.4. Критерии оценки.

Вакцина может считаться безвредной, если:

а) через 72 ч групповая масса тела мышей не ниже их массы тела перед введением препарата;

б) через 7 сут. после введения препарата относительный прирост массы тела мышей, получивших испытуемую вакцину, составляет не менее 60 % прироста массы тела контрольных мышей, и не менее абсолютного и относительного прироста массы тела мышей, получивших ОСО 42-28-89-01П;

в) относительный прирост массы тела мышей, получивших ОСО 42-28-89-01П, соответствует установленному показателю.

Если при проведении опыта одно из указанных условий нарушается, опыт повторяется на удвоенном количестве животных при тех же условиях учёта опыта. Допускается гибель не более 5 % от общего числа животных.

6.6.2. Оценка остаточного содержания термолабильного (дермонекротического) токсина

Определяют при подкожном введении испытуемых КВ в затылочную область мышей-сосунков или при внутрикожном введении белокожим кроликам породы шиншилла.

КВ, содержащая 1 МЕ в объеме 0,05 мл, не должна вызывать изменения кожных покровов у мышей-сосунков.

КВ, содержащая 4 МЕ в объеме 0,2 мл, не должна вызывать у кроликов некроза; допускается гиперемия диаметром не более 10 мм. На месте введения живой культуры – некроз размером 0,5—2 см в диаметре.

6.6.3. Оценка лейкоцитостимулирующей активности

6.6.3.1. Подготовка к применению ОСО 42-28-89-01П и испытуемого препарата.

Содержимое одной ампулы ОСО 42-28-89-01П растворяют в 3 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2 – рабочее разведение.

Мутность используемой коклюшной вакцины предварительно доводят до 20 МЕ в 1 мл.

6.6.3.2. Условия и порядок применения.

Для оценки лейкоцитостимулирующей активности в коклюшной вакцине, приготовленной из штамма, используют мышей массой (15 ± 1) г. Оценку лейкоцитостимулирущей активности проводят параллельно с ОСО 42-28-89-01П.

Формируют 3 группы животных по 10 мышей в каждой. Животным в 1 и во 2 группах вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл (10 МЕ в дозе) испытуемого препарата и ОСО 42-28-89-01П соответственно. Контрольным животным вводят по 0,5 мл апирогенного 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2.

6.6.3.3. Оценка результатов.

Через 72—96 ч у опытных и контрольных животных берут кровь из хвостовой вены. Для лучшего счёта лейкоцитов кровь разводят 3 %-м раствором уксусной кислоты, подкрашенной 1 %-м раствором генцианвиолета. Количество лейкоцитов подсчитывают в камере Горяева.

Вычисление количества лейкоцитов в 1 мм^3 крови проводят по формуле:

$$X = \frac{a \ 4\,000 \ y}{б}, \text{ где}$$

X – число лейкоцитов в 1 мм^3 крови;

a – общее число клеток в «б» квадратах;

y – разведение крови.

Для сравнительной оценки лейкоцитостимулирующей активности разных серий вакцин рассчитывают индекс ЛСА (лейкоцитостимулирующей активности): отношение количества лейкоцитов опытных мышей к числу лейкоцитов животных, получивших ОСО 42-28-89-01П.

6.6.3.4. Критерии оценки.

Опыт можно считать удовлетворяющим требованиям, если количество лейкоцитов контрольных животных находится в пределах нормы (от 5 000 до 12 000).

Вакцину следует считать слаботоксичной, если индекс ЛСА по отношению к ОСО 42-28-89-01П составляет 0,5 и меньше; средней токсичности, если индекс ЛСА находится в пределах от 0,5 до 1,0; с выраженной токсичностью, если индекс ЛСА более 1,0.

Для производства коклюшного компонента комплексных вакцин используют штаммы со слабой и средней токсичностью.

6.6.4. Оценка гистаминсенсибилизирующей активности

Определение гистаминсенсибилизирующей активности штаммов проводят параллельно с ОСО 42-28-87-02П.

6.6.4.1. Подготовка к применению ОСО 42-28-87-02П и коклюшной вакцины.

Во флакон с ОСО, содержащим лиофилизированные коклюшные бактерии, эквивалентные 150 МЕ, добавляют 7,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2. Мутность коклюшной вакцины, приготовленной из штамма, доводят до 20 МЕ в 1 мл.

Определение гистаминсенсибилизирующей дозы (ГСД) штаммов проводят параллельно с ОСО 42-28-87-02П. В опыте используют мышей-самок или поровну животных обоего пола тех линий, которые чувствительны к коклюшному токсину. На каждый препарат берут три группы мышей (по 10—20 мышей в каждой) массой 14—16 г.

Для определения $ГСД_{50}$ ОСО 42-28-87-02П вакцины каждой группе животных вводят однократно внутрибрюшинно по 0,5 мл препарата соответствующего пятикратного разведения препарата (при испытании на беспородных животных первое разведение должно содержать 20 или 10 МЕ в объёме 0,5 мл).

Контрольным животным вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2. Через 4—5 дней опытным и контрольным животным вводят внутрибюшинно по 2 мг гистамина дигидрохлорида, разведённого так, чтобы опытная доза содержалась в 0,5 мл.

6.6.4.2. Оценка результатов.

Гибель мышей учитывают через 2 и 24 ч. $ГСД_{50}$ рассчитывают по методу Кербера (прилож. 2). Животные, получившие 0,9 %-й раствор натрия хлорида, должны остаться живыми.

Для проведения сравнительного анализа штаммов по гистаминсенсибилизирующим свойствам рассчитывают индекс ГСА:

$$И_{ГСА} = \frac{ГСД_{50}в}{ГСД_{50}осо}, \text{ где}$$

$ГСД_{50}в$ – доза вакцины, при которой погибло 50 % иммунизированных животных после введения гистамина;

$ГСД_{50}осо$ – доза ОСО 42-28-87-02П, при которой погибло 50 % иммунизированных животных после введения гистамина.

6.6.4.3. Критерии оценки.

КВ следует считать слаботоксичной, если индекс ГСА по отношению к ОСО 42-28-87-02П будет равен 0,5 или меньше; среднетоксичной, если индекс ГСА будет находиться в пределах от 0,5 до 1,0; и с выраженными гистаминсенсибилизирующими свойствами, если индекс ГСА будет 1,0 и более.

Для производства коклюшного компонента комплексных вакцин используют штаммы со слабой и средней токсичностью.

6.7. Методика определения защитных свойств штаммов коклюшных бактерий

Защитные свойства вакцин определяют по количеству международных защитных единиц (МЗЕ). Для получения ориентировочной информации о специфической защитной активности штамма используют метод оценки по выживаемости зараженных животных. В частности, этот метод используют при изучении свежевыделенных штаммов.

В испытании необходимо использовать те линии животных, которые способны давать адекватный иммунный ответ (например, популяцию скрещенных линий F1 (C57BL/6Jx CBA).

Необходимо соблюдать принцип случайного распределения животных по группам, случайным должно быть и расположение клеток на полках, порядок иммунизации и порядок введения разрешающей дозы.

В опыт берут здоровых мышей одного штамма и одного пола или поровну каждого пола во всех группах, массой 10—12 г. Одновременно из этой же партии оставляют 40 мышей для титрования $ЛД_{50}$ культуры, используемой для заражения вакцинированных мышей. Перед иммунизацией за ними наблюдают 3—4 сут. При гибели более 10 % животных всю партию мышей бракуют.

Коклюшкая вакцина, приготовленная из каждого штамма, при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозе, содержащей микробные клетки в концентрации $0,75 \cdot 10^9$, при заражении животных вирулентным штаммом *B. pertussis* № 18323 должна обеспечивать выживаемость не менее 70 %. Суспензия, мутностью 20 МЕ должна содержать не менее 10 международных защитных единиц (МЗЕ).

6.7.1. Определение защитных свойств по выживаемости

Испытуемую вакцину разводят 0,9 %-м раствором натрия хлорида до мутности 15 МЕ микробных клеток в 1 мл (по расчёту, исходя из обозначенного количества микробных клеток), а затем ещё в 10 раз.

Пример: 1 разведение – 0,9 мл 20 МЕ/мл вакцины + 0,3 мл физиологического раствора = 1,2 мл (15 МЕ/мл), 2 разведение (рабочее) – 1 мл вакцины + 9 мл физиологического раствора = 10 мл (1,5 МЕ/мл), т. е. 0,5 мл содержит 0,750 МЕ.

Приготовленным разведением вакцины 0,750 МЕ в 0,5 мл внутрибрюшинно однократно иммунизируют 20 мышей.

Если гибель мышей в период между вакцинацией и заражением превышает 10 % от общего числа взятых в опыт животных, опыт не подлежит учёту.

Спустя 14—17 сут. после иммунизации мышей заражают интрацеребрально культурой *B. pertussis* № 18323. По морфологическим, культуральным, агглютинабельным, дермонекротическим и вирулентным свойствам этот штамм должен соответствовать всем требованиям, изложенным в разделе 1.

Для сохранения постоянства вирулентности заражающего штамма его хранят в лиофилизированном состоянии при температуре (5 ± 3) °С. Для заражения штамм восстанавливают из высушенного состояния и используют только 2 или 3 пассаж. Суспензию для заражения готовят из 20—24-часовой культуры (которая была засеяна из быстрорастущей культуры возрастом не более 30 ч), выращенной при температуре (36,0 ± 0,5) °С на свежей среде Борде-Жангу или КУА с добавлением 10 % крови (срок хранения крови не более 2 сут.). Продолжительность работы со взвесью не должна превышать 2,5 ч с момента смыва культуры. При разведении и в процессе заражения взвесь необходимо хранить на льду.

Микробную массу снимают со среды стеклянной петлей, проверяют на морфологию (мазок, окрашенный по Граму) и суспендируют в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, для чего стенку стандартной пробирки смачивают 0,9 %-м раствором натрия хлорида. Затем стеклянной петлей снимают небольшое количество культуры и тщательно растирают на смоченном участке пробирки до гомогенной массы. Культуру, осторожно смачивая содержимым пробирки, смывают со стенки. Операцию повторяют до получения мутности взвеси, равной 10 МЕ в 1 мл. Полученная суспензия должна быть гомогенной. В случае обнаружения комочков культуры, суспензию фильтруют через стерильную вату, помещённую в пробирку с культурой, и доводят её мутность до 10 МЕ в 1 мл.

Все дальнейшие разведения делают в 1 % растворе гидролизата казеина, содержащего 0,6 % натрия хлорида pH 7,1 ± 0,2. Каждую серию гидролизата казеина предварительно проверяют на безвредность путём внутримозгового введения 5 мышам по 0,03 мл. Животные должны оставаться живыми и здоровыми в течение 3 дней.

Микробную суспензию, мутностью 10 МЕ микробных тел в 1 мл (разведение А в табл. 3), разводят последовательно так, чтобы получить заражающую дозу, содержащую 100 000 микробных клеток (рабочая суспензия), в объёме 0,03 мл. Из рабочей суспензии делают разведения 1/10, 1/50, 1/250 и 1/1 250 для определения $ЛД_{50}$ штамма и проверки жизнеспособности микробов в суспензии.

Таблица 3

Схема разведения вирулентного штамма коклюшных бактерий

Пробирка №	Кратность разведения	Объем, мл		Полученная суспензия содержит в 0,03 мл (эквивалентно)	Использование
		переносимой суспензии из предыдущей пробирки в последующую	внесенного растворителя		
1	$1_A : 3$	1,0	2,0	100 млн	
2	$1_1 : 10$	0,5	4,5	10 млн	
3	$1_2 : 10$	0,5	4,5	1 млн	
4	$1_3 : 10$	2,0	18,0	100 000	Разливают в 3 пробирки для заражения – рабочая суспензия
5	$1_4 : 10$	0,5	4,5	10 000	Для определения $ЛД_{50}$ штамма
6	$1_5 : 5$	1,0	4,0	2 000	
7	$1_6 : 5$	1,0	4,0	400	
8	$1_7 : 5$	1,0	4,0	80	

Из 8 пробирки, сразу после приготовления разведения, делают посев по 0,1 мл на 3 чашки со свежеприготовленной средой Борде-Жангу (без конденсата) или с КУА с кровью. Растирают культуру стерильным шпателем и помещают в термостат с температурой (36,0 ± 0,5) °С.

Культуру в биксе (пробирки №№ 4, 5, 6, 7, 8) переносят в виварий. В течение всего периода заражения культура должна находиться в холодной водяной бане (вода со льдом). Каждой мыши вводят без наркоза в объёме 0,03 мл рабочей суспензии (пробирка № 4) в височнотеменную

область туберкулиновым шприцем с тонкой острой иглой (№ 27) с коротким срезом и муфтой. Длина свободного конца иглы от края муфты до начала среза должна быть 3 мм. Для определения величины LD_{50}, разведения заражающей дозы (пробирки №№ 5, 6, 7, 8) также интрацеребрально вводят контрольным мышам.

За заражёнными мышами наблюдают 14 дней с ежедневной регистрацией их гибели в опытной и контрольной группах. Мышей, погибших в течение 72 ч после заражения, исключают из опыта (неспецифическая гибель).

В день учёта результатов в число погибших включают также всех явно парализованных мышей.

Вычисление $ЛД_{50}$ культуры производят по методу Кербера (прилож. 2) или используя пробит-анализ. 1 LD_{50} не должна превышать 1 000 микробных клеток.

Заражающая доза 10^5 микробных клеток должна содержать не менее 100 LD_{50}.

Штамм считают пригодным для дальнейшего изучения, если вакцина обеспечивает выживаемость более 70 % мышей при заражении их не менее 100 $ЛД_{50}$ вирулентной коклюшной культурой.

3 чашки с культурой, высеянной из пробирки № 8, находятся в термостате 3—4 сут. После подсчёта колоний на 3-х чашках полученное число делят на 10. В 0,03 мл этого разведения должно быть не менее 10 и не более 50 колониеобразующих единиц.

6.7.2. Определение количества международных защитных единиц (МЗЕ)

Количество МЗЕ в суспензии определяют по результатам опытов на мышах одновременно поставленных с испытуемой вакциной и ОСО иммуногенности коклюшной вакцины, откалиброванному по Международному стандарту коклюшной вакцины (ОСО 42-28-89-01П).

При проверке защитных свойств штаммов с определением международных защитных единиц (МЗЕ) вакцина мутностью 20 МЕ в 1 мл должна содержать не менее 10 МЗЕ.

Для каждой вакцины берут три группы по 18—20 здоровых мышей (масса тела (11 ± 1) г одной линии (например, F1 (C57BL/6J x CBA) и одного пола или в равных количествах каждого пола во всех группах. Одновременно для контроля заражающей суспензии берут четыре группы по 10 мышей.

6.7.2.1. Разведение вакцин.

В стерильных условиях делают три пятикратных разведения испытуемой вакцины и ОСО 42-28-89-01П на 0,9 %-м растворе натрия хлори-

да pH 7,0 ± 0,2 так, чтобы вводимая иммунизирующая доза содержалась в 0,5 мл. Все разведения испытуемой вакцины должны иметь такое же количество МЗЕ, что и соответствующие разведения стандартной вакцины. С этой целью вакцину разводят в 10, 12 или 14 раз для того, чтобы в одной вводимой иммунизирующей дозе содержалось 0,5 МЗЕ. При этом $ЕД_{50}$ вакцины должна быть в пределах избранных разведений.

6.7.2.2. Подготовка к применению ОСО 42-28-89-01П.

Одна ампула ОСО содержит 30 МЗЕ. Содержимое ампулы с ОСО растворяют в 30 мл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,0 ± 0,2 из расчёта, чтобы в 1 мл содержалась 1 МЗЕ (разведение 1). В ампулу с ОСО вначале вносят 2 мл растворителя. После того, как таблетка растворилась (1—2 мин), тонкой пастеровской пипеткой тщательно отбирают содержимое в стерильный флакон (ёмкостью не менее 30 мл). Затем в ампулу повторно (2—3 раза) вносят по 2 мл растворителя той же пипеткой и тщательно отбирают содержимое ампулы той же пастеровской пипеткой в вышеуказанный флакон. Остальное количество растворителя добавляют во флакон до нужного объема (30 мл) пипеткой (разведение 1). Из первого разведения ОСО делают два последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 4).

Таблица 4

Схема разведения ОСО 42-28-89-01П

Разведения	Количество, мл		Кратность разведений исходной (сухой) вакцины (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза в объеме 0,5 мл	
	вакцины 1 разведения	0,9 %-й р-р натрия хлорида		в мл исходной вакцины (препарата ОСО)	в МЗЕ
1	15,0	0,0	1 : 60	0,0167	0,5
2	2,5	10,0	1 : 300	0,0033	0,1
3	0,5	12,0	1 : 1 500	0,00066	0,02

ОСО в разведении 1 : 30 может быть использован в двух опытах, если интервал между опытами не превышает 1 месяц. Остаток разведённого ОСО хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

6.7.2.3. Подготовка к применению испытуемого препарата.

К 1 мл испытуемого препарата, содержащего 20 МЕ коклюшных бактерий, добавляют 13 мл физиологического раствора – разведение 1 (при разведении вакцины 1 : 14). Из разведения 1 делают два последующих пятикратных разведения по схеме (табл. 5).

Таблица 5

Схема разведения испытуемой вакцины

Разведения	Количество, мл		Кратность разведений исходной вакцины (в 0,5 мл)	Иммунизирующая доза в объеме 0,5 мл	
	вакцины 1 разведения	0,9 %-й р-р натрия хлорида		в мл исходной вакцины	в МЗЕ (предполагаемое содержание)
1	14,0	0,0	1 : 28	0,0357	0,5
2	2,5	10,0	1 : 140	0,0071	0,1
3	0,5	12,0	1 : 700	0,00142	0,02

Если фактическое $ЕД_{50}$ испытуемой вакцины будет больше избранной, то необходимо изменить разведение 1: исходную вакцину развести в 10 или 8 раз. Два последующих разведения делать по вышеприведенной схеме.

6.7.2.4. Иммунизация и заражение животных.

Трем группам мышей, предназначенных для иммунизации препаратом ОСО, внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 1-го, 2-го и 3-го разведений ОСО соответственно.

Трем группам мышей, предназначенных для иммунизации испытуемым препаратом КВ, также внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл 1-го, 2-го и 3-го разведений КВ соответственно.

Заражение проводят по методике, описанной в п. 6.7.1.

6.7.2.5. Оценка результатов.

Величину $ЕД_{50}$ ОСО иммуногенности и испытуемого препарата определяют по методу Вильсона и Вустера с использованием таблиц Национального института здоровья США для n = 16 (прилож. 4). В таблице по вертикальной оси слева находят величину, выражающую сумму выживших мышей от всех трёх доз препарата (А), по горизонтальной – величину, выражающую разницу между числом мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз, взятых в опыте (В). В месте пересечения прямых, проведённых от соответствующих величин А и В, находят $ЕД_{50}$ (верхняя цифра) и её стандартные отклонения, выраженные в процентах (нижние цифры). Это величина $ЕД_{50}$ для средней иммунизирующей дозы, равной 100 мл. Для определения величины $ЕД_{50}$ в опыте найденную в таблице $ЕД_{50}$ разделить на 100 и умножить на среднюю иммунизирующую дозу в данном конкретном опыте. Результаты опыта можно

считать достоверными, если стандартные отклонения будут не ниже 64 % и не выше 157 %.

Таблица 6

Пример расчёта

Препарат	Разведение	Доза препарата в 0,5 мл		Количество выживших мышей/ общее число зараженных доз	Величины A/B и $ЕД_{50}$ по таблице	$ЕД_{50}$ стандартные отклонения в опыте
		исходного препарата, мл	МЗЕ в иммунизирующей дозе			
ОСО (30 МЗЕ в амп.).	1 : 60	0,0166	0,5	14/16	27/11	0,00235
	1 : 300	0,0033	0,1	10/16	71,3	(0,00327—0,00169)
	1 : 1 500	0,00066	0,02	3/16	72—139	
КВ сер. X	1 : 28	0,0376		13/16	23/11	0,00793
	1 : 140	0,0071		8/16	111,75	(0,011—0,0057)
	1 : 700	0,00142		2/16	72—139	

$$ЕД_{50}\,осо = \frac{71{,}3 \cdot 0{,}0033}{100} = 0{,}00235\ мл$$

$$ЕД_{50}\,макс. = \frac{0{,}00235 \cdot 139}{100} = 0{,}00327\ мл$$

$$ЕД_{50}\,мин. = \frac{0{,}00235 \cdot 72}{100} = 0{,}00169\ мл$$

$$ЕД_{50}\,вакц. = \frac{111{,}75 \cdot 0{,}0071}{100} = 0{,}00793\ мл$$

$$ЕД_{50}\,макс. = \frac{0{,}00793 \cdot 139}{100} = 0{,}011\ мл$$

$$ЕД_{50}\,мин. = \frac{0{,}00793 \cdot 72}{100} = 0{,}0057\ мл$$

Количество МЗЕ в 1 мл вакцины определяется по формуле:

$$X = \frac{ЕД_{50}осо}{ЕД_{50}вакц.} \cdot 30 \qquad МЗЕ\ ОСО = \frac{0{,}00235}{0{,}00793} \cdot 30 = 8{,}9\ МЗЕ$$

Доверительный интервал МЗЕ в 1 мл препарата рассчитывают по формуле:

$$R_{мин./макс.} = R :/ \cdot K, \quad где$$

R – количество МЗЕ в 1 мл препарата;

K – доверительный коэффициент.

K = анти lg $\sqrt{S_1^2 + S_2^2}$, где

S_1 = (lg ЕД$_{50}$)$_{макс.}$ – lg ЕД$_{50}$ для более иммуногенного препарата при избранном уровне существенности различия – 95 или 99 %;

S_2 = lg ЕД$_{50}$ – (lg ЕД$_{50}$)$_{мин.}$ для менее иммуногенного препарата.

Для нашего примера:

$$K = \text{антилg}\sqrt{[-2{,}4855 - (-2{,}6289)]^2 + [-2{,}1007 - (-2{,}2441)]^2} =$$

$$= \text{антилg}\sqrt{0{,}0206 + 0{,}0206} = \text{антилg}\sqrt{0{,}0412} = \text{антилg } 0{,}203$$

K = 1,6

Отсюда:

$R_{мин.} = R : K$; т. е. 8,9 МЗЕ : 1,6 = 5,6 МЗЕ

$R_{макс.} = R \cdot K$; т. е. 8,9 МЗЕ · 1,6 = 14,2 МЗЕ

Таким образом, в 1 мл КС серии Х содержится 8,9 МЗЕ с доверительным интервалом от 5,6 до 14,2 МЗЕ.

6.7.2.5. Критерии оценки активности.

Коклюшная вакцина (20 МОЕ/мл) будет считаться отвечающей требованиям, если в прививочной дозе (0,5 мл) будет содержаться не менее 5 МЗЕ.

Если в первом опыте вакцина не будет соответствовать требованиям по активности, опыт повторяют. Если опыт повторяют 2—3 раза, то при вычислении количества МЗЕ в препарате необходимо учитывать данные всех опытов. При этом учёту подлежат только те опыты, в которых отклонения ЕД$_{50}$, выраженные в процентах, находятся в пределах от 64 до 157 %.

Пример расчёта средней величины МЗЕ в 1 мл препарата:

Иммуногенность коклюшного компонента в АКДС вакцине серии У определили в двух опытах. В первом опыте в 1 мл препарата было определено 6 МЗЕ, во втором опыте – 10,8 МЗЕ.

1-й метод расчёта:

Xгеом.= $\sqrt[n]{\text{Пх}}$, где

Пх – произведение осредняемых величин;

n – число единичных определений.

Xгеом. = $\sqrt{6 \cdot 10{,}8}$ = 8,05 МЗЕ

2-й метод расчёта:

$$X = \frac{\lg 6 + \lg 10{,}8}{2} = \frac{0{,}7782 + 1{,}0334}{2} = 0{,}9058$$

*X*геом. = антилg 0,9058 = 8,05 МЗЕ.

Количество МЗЕ в испытуемой КВ можно также определять по методу пробит-анализа.

7. Возможность обновления производственных штаммов

Новые штаммы, предназначенные для изготовления коклюшного компонента ассоциированных вакцин, производства диагностических препаратов, аттестует Федеральное государственное учреждение науки научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича).

ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича хранит коллекцию всех производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. Новые изученные штаммы для пополнения коллекции производственных штаммов должны поступать в ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича с соответствующей характеристикой (прилож. 3).

Новые штаммы коклюшных бактерий, отбираемые для пополнения коллекции производственных штаммов, должны быть изучены по всем вышеуказанным свойствам.

Приложение 1

Среда Борде-Жангу

Приготовление картофельного отвара.

К 1 л дистиллированной воды прибавляют 0,5 кг очищенного мелко нарезанного картофеля и 40 мл глицерина, кипятят в закрытой посуде до размягчения картофеля. Затем доливают дистиллированную воду до прежнего объема, процеживают через марлю.

К 500 мл фильтрата прибавляют 1,5 л солевого раствора, в состав которого входят следующие соли:

K_2HPO_4 – 2,25 г;

KH_2PO_4 – 0,75 г;

KCl – 1,5 г;

$MgSO_4$ – 0,075 г;

NaCl – 7,5 г.

Солевой раствор должен иметь pH 7,4—7,5.

Затем прибавляют 60 г агара и кипятят на асбестовой сетке при перемешивании до полного растворения агара. Устанавливают pH 7,1—7,2, фильтруют через марлю с толстым слоем ваты. Затем разливают в стерильную посуду и стерилизуют при 110 °С 30 мин.

Среда КУА

Пропись среды на 1 л.

Гидролизат казеина – (170 ± 5) мл (берется из расчета, чтобы в готовой среде содержалось аминного азота 150—160 мг %);

Дрожжевой диализат – (90 ± 10) мл;

KH_2PO_4 – 0,5 г;

$MgCl_2$ – 0,4 г;

Крахмал растворимый – 1,5 г;

$CaCl_2$ – 0,01 г;

$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0,01 г;

$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$;

Цистеин – 0,03 г;

Агар – (27,5 ± 2,5) г;

Уголь активированный – 2 г.

В среде содержание хлоридов должно составлять (0,75 ± 0,15) %, аминного азота (155 ± 10) мг %, pH доводят до (7,0 ± 0,1).

Приложение 2

Подсчет $ЛД_{50}$ по методу Кербера

$ЛД_{50}$ – дозу, вызывающую гибель 50 % взятых в опыт животных, рассчитывают по следующей формуле:

$$\lg ЛД_{50} = \lg D_N - \delta(\Sigma L_i - 0{,}5),$$ где

D_N – максимальная из испытанных доз;

δ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей, т. е. логарифм кратности испытуемых разведений;

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

ΣL_i – сумма значений, найденных для всех испытанных доз.

Пример:

Дозы (количество микробов)	Получено в опыте		L_i	ΣL_i
	выжило	пало		
10 000	1	9	0,9	2,2
2 000	3	7	0,7	
400	6	4	0,4	
80	8	2	0,2	

$\lg ЛД_{50} = \lg 10\,000 - \lg 5(2{,}2 - 0{,}5) = 4{,}0 - 0{,}699 \times 1{,}7 = 4{,}0 - 1{,}1883 = 2{,}8117$

$ЛД_{50}$ = 648 микробных клеток.

Таким образом, $ЛД_{50}$ в данном примере составляет 648 микробных клеток.

Приложение 3

ПАСПОРТ
НА ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ШТАММ

Название штамма

№ и особое обозначение штамма .....
Дата и порядковой номер сушки .....
Получен из .....
Дата получения ..... выделен .....

Характеристика штамма

Морфология .....
Подвижность .....
Форма колоний ..... окраска по Грамму .....

Рост на мясопептонном агаре
Гемолиз

Серологические свойства

Дата проверки	Сыворотка коклюшная				Сыворотка паракоклюшная				Сыворотка к агглютиногенам				
	серия	титр	результат		серия	титр	результат		1	2	3	12	14
			визуально	в агглютиноскоп			визуально	в агглютиноскоп					

Гемагглютинирующая активность

Титр:

Вирулентность для мышей

Дата проверки	$ЛД_{50}$ в МЕ при заражении	
	интраназальном	интрацеребральном

Дермонекротическая активность

Дата проверки	Кролики			Мыши-сосунки		
	некроз в мм^2 на дозу в МЕ			гиперемия в мм^2 на дозу в МЕ		
	2	1	0,5	2	1	0,5

Токсичность в тесте изменения массы тела мышей

Дата проверки	Масса тела перед введением препарата	Прирост массы тела через		
		72 часа	7 суток	
		абсолютный прирост, г	абсолютный прирост, г	относительный прирост, %

Лейкоцитозстимулирующая активность

Дата проверки	Вакцина	Абсолютное количество лейкоцитов	Индекс ЛСА
	ОСО		
	Испытуемая		
	Контроль (физ. р-р)		

Гистаминсенсибилизирующая активность

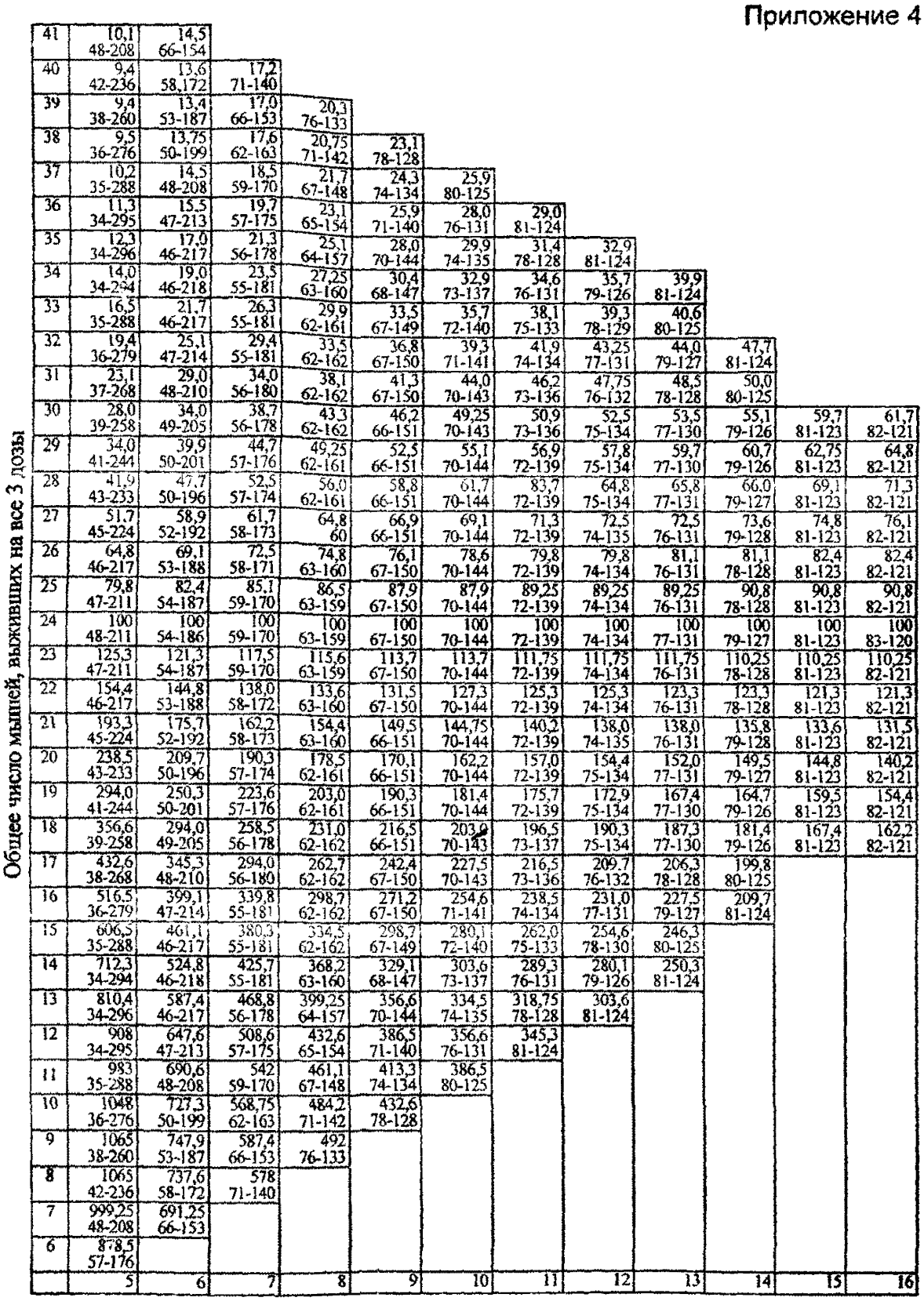
Дата проверки	Вакцина	Дозы препарата	Дата введения гистамина	Доза гистамина на мышь	пало / выжило	$ГСД_{50}$	Индекс ГСА

Защитные свойства

Вакцина (№ штамма дата лиофилизации)	Дата приготовления вакцины	Дата иммунизации мышей	Дозы	Количество иммунизированных мышей	Дата заражения	№ заражающего штамма дата лиофилизации, доза в 0,03 мл	Количество зараженных мышей
1	2	3	4	5	6	7	8

Дни наблюдения	Пало	Выжило	$ЛД_{50}$	$ЕД_{50}$	Количество МЗЕ в 1 мл вакцины
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14					
9	10	11	12	13	14

Приложение 4



Общее число мышей, выживших на все 3 дозы	Разница выживших от наибольшей и наименьшей дозы											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
41	10,1 48-208	14,5 66-154										
40	9,4 42-236	13,6 58,172	17,2 71-140									
39	9,4 38-260	13,4 53-187	17,0 66-153	20,3 76-133								
38	9,5 36-276	13,75 50-199	17,6 62-163	20,75 71-142	23,1 78-128							
37	10,2 35-288	14,5 48-208	18,5 59-170	21,7 67-148	24,3 74-134	25,9 80-125						
36	11,3 34-295	15,5 47-213	19,7 57-175	23,1 65-154	25,9 71-140	28,0 76-131	29,0 81-124					
35	12,3 34-296	17,0 46-217	21,3 56-178	25,1 64-157	28,0 70-144	29,9 74-135	31,4 78-128	32,9 81-124				
34	14,0 34-294	19,0 46-218	23,5 55-181	27,25 63-160	30,4 68-147	32,9 73-137	34,6 76-131	35,7 79-126	39,9 81-124			
33	16,5 35-288	21,7 46-217	26,3 55-181	29,9 62-161	33,5 67-149	35,7 72-140	38,1 75-133	39,3 78-129	40,6 80-125			
32	19,4 36-279	25,1 47-214	29,4 55-181	33,5 62-162	36,8 67-150	39,3 71-141	41,9 74-134	43,25 77-131	44,0 79-127	47,7 81-124		
31	23,1 37-268	29,0 48-210	34,0 56-180	38,1 62-162	41,3 67-150	44,0 70-143	46,2 73-136	47,75 76-132	48,5 78-128	50,0 80-125		
30	28,0 39-258	34,0 49-205	38,7 56-178	43,3 62-162	46,2 66-151	49,25 70-143	50,9 73-136	52,5 75-134	53,5 77-130	55,1 79-126	59,7 81-123	61,7 82-121
29	34,0 41-244	39,9 50-201	44,7 57-176	49,25 62-161	52,5 66-151	55,1 70-144	56,9 72-139	57,8 75-134	59,7 77-130	60,7 79-126	62,75 81-123	64,8 82-121
28	41,9 43-233	47,7 50-196	52,5 57-174	56,0 62-161	58,8 66-151	61,7 70-144	83,7 72-139	64,8 75-134	65,8 77-131	66,0 79-127	69,1 81-123	71,3 82-121
27	51,7 45-224	58,9 52-192	61,7 58-173	64,8 60	66,9 66-151	69,1 70-144	71,3 72-139	72,5 74-135	72,5 76-131	73,6 79-128	74,8 81-123	76,1 82-121
26	64,8 46-217	69,1 53-188	72,5 58-171	74,8 63-160	76,1 67-150	78,6 70-144	79,8 72-139	79,8 74-134	81,1 76-131	81,1 78-128	82,4 81-123	82,4 82-121
25	79,8 47-211	82,4 54-187	85,1 59-170	86,5 63-159	87,9 67-150	87,9 70-144	89,25 72-139	89,25 74-134	89,25 76-131	90,8 78-128	90,8 81-123	90,8 82-121
24	100 48-211	100 54-186	100 59-170	100 63-159	100 67-150	100 70-144	100 72-139	100 74-134	100 77-131	100 79-127	100 81-123	100 83-120
23	125,3 47-211	121,3 54-187	117,5 59-170	115,6 63-159	113,7 67-150	113,7 70-144	111,75 72-139	111,75 74-134	111,75 76-131	110,25 78-128	110,25 81-123	110,25 82-121
22	154,4 46-217	144,8 53-188	138,0 58-172	133,6 63-160	131,5 67-150	127,3 70-144	125,3 72-139	125,3 74-134	123,3 76-131	123,3 78-128	121,3 81-123	121,3 82-121
21	193,3 45-224	175,7 52-192	162,2 58-173	154,4 63-160	149,5 66-151	144,75 70-144	140,2 72-139	138,0 74-135	138,0 76-131	135,8 79-128	133,6 81-123	131,5 82-121
20	238,5 43-233	209,7 50-196	190,3 57-174	178,5 62-161	170,1 66-151	162,2 70-144	157,0 72-139	154,4 75-134	152,0 77-131	149,5 79-127	144,8 81-123	140,2 82-121
19	294,0 41-244	250,3 50-201	223,6 57-176	203,0 62-161	190,3 66-151	181,4 70-144	175,7 72-139	172,9 75-134	167,4 77-130	164,7 79-126	159,5 81-123	154,4 82-121
18	356,6 39-258	294,0 49-205	258,5 56-178	231,0 62-162	216,5 66-151	203,9 70-143	196,5 73-137	190,3 75-134	187,3 77-130	181,4 79-126	167,4 81-123	162,2 82-121
17	432,6 38-268	345,3 48-210	294,0 56-180	262,7 62-162	242,4 67-150	227,5 70-143	216,5 73-136	209,7 76-132	206,3 78-128	199,8 80-125		
16	516,5 36-279	399,1 47-214	339,8 55-181	298,7 62-162	271,2 67-150	254,6 71-141	238,5 74-134	231,0 77-131	227,5 79-127	209,7 81-124		
15	606,5 35-288	461,1 46-217	380,3 55-181	334,5 62-162	298,7 67-149	280,1 72-140	262,0 75-133	254,6 78-130	246,3 80-125			
14	712,3 34-294	524,8 46-218	425,7 55-181	368,2 63-160	329,1 68-147	303,6 73-137	289,3 76-131	280,1 79-126	250,3 81-124			
13	810,4 34-296	587,4 46-217	468,8 56-178	399,25 64-157	356,6 70-144	334,5 74-135	318,75 78-128	303,6 81-124				
12	908 34-295	647,6 47-213	508,6 57-175	432,6 65-154	386,5 71-140	356,6 76-131	345,3 81-124					
11	983 35-288	690,6 48-208	542 59-170	461,1 67-148	413,3 74-134	386,5 80-125						
10	1048 36-276	727,3 50-199	568,75 62-163	484,2 71-142	432,6 78-128							
9	1065 38-260	747,9 53-187	587,4 66-153	492 76-133								
8	1065 42-236	737,6 58-172	578 71-140									
7	999,25 48-208	691,25 66-153										
6	878,5 57-176											

Таблица используется при подсчете 50-процентной эффективной дозы при применении метода Вильсона-Вустер*. Значения в таблице применимы к опыту с 3-мя дозами, по 16 мышей на каждую дозу и 5-кратным шагом между дозами. Значение $ЕД_{50}$ – верхнее число каждой клетки таблицы для опыта со средней дозой равной 100. Для других средних доз величину $ЕД_{50}$ делят на 100 и умножают на величину использованной дозы. Две цифры ниже значения $ЕД_{50}$ указывают лимиты одного стандартного отклонения в процентах.

* Nat. Acad. Sc. Proc. 1943, v.29, p. 207-212.

Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий

Методические указания
МУК 4.2.2317—08

Редакторы Е. В. Емелиянова, Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 29.07.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,75
Тираж 500 экз. Заказ 43

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

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

gost.e-ecolog.ru