Государственное
санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

# Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона

**Методические указания**
**МУ 3.3.1.2075—06**

Издание официальное

Москва
2006

gost.e-ecolog.ru

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

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

# Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона

**Методические указания**
**МУ 3.3.1.2075—06**

ББК 51.9
О75

О75 **Основные** требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — 67 с.

ISBN 5—7508—0648—0

1. Разработаны: Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (В. В. Кутырев, Т. Н. Щуковская, Н. И. Смирнова, Г. А. Ерошенко, А. Н. Куличенко, З. В. Малыхина, С. Ю. Задумина, Е. Ю. Лоцманова, Т. В. Бугоркова, С. А. Бугоркова, М. Н. Ляпин); Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (Н. В. Медуницын, Т. И. Анисимова, Л. В. Саяпина, Г. В. Адамова); Ростовским-на-Дону научно-исследовательским противочумным институтом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Э. А. Бардахчьян, Е. В. Монахова); Научно-исследовательским институтом микробиологии Министерства обороны Российской Федерации (И. В. Парамонов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

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 11 июля 2006 г.

4. Введены взамен методических указаний «Основные критерии оценки вакцинных штаммов холерного вибриона», утв. Госкомсанэпиднадзором России от 17 октября 1994 г. № 01-19/48-11.

**ББК 51.9**

ISBN 5—7508—0648—0

© **Роспотребнадзор, 2006**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006**

## Содержание

1. Область применения ..... 4
2. Общие положения ..... 4
3. Порядок проведения работ с вакцинными штаммами холерного вибриона ..... 5
4. Идентификация штамма по видовым признакам ..... 6
5. Характеристика потенциальной опасности и безвредности штамма ..... 8
6. Генетическая стабильность вакцинных штаммов ..... 18
7. Характеристика иммунологической активности вакцинного штамма ..... 18
8. Определение протективных свойств вакцинного штамма на взрослых кроликах ..... 18
9. Изучение стабильности штамма в производственных условиях ..... 19
10. Заключение ..... 20
Библиографические данные ..... 21
*Приложение 1.* Определение отсутствия у вакцинного штамма холерного вибриона гена, кодирующего синтез А-субъединицы холерного токсина методом ПЦР ..... 22
*Приложение 2.* Определение отсутствия у вакцинного штамма холерного вибриона функционально полноценного гена, кодирующего синтез токсинкорегулируемых пилей адгезии, методом ПЦР ..... 24
*Приложение 3.* Определения «остаточной» вирулентности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков ..... 30
*Приложение 4.* Определение «остаточной» токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) холерного вибриона в кожной пробе на взрослых кроликах ..... 33
*Приложение 5.* Определение безвредности и «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона при внутрикишечном введении кроликам-сосункам ..... 35
*Приложение 6.* Определение «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов ..... 36
*Приложение 7.* Определение безвредности, «остаточной» токсигенности, реактогенности и приживаемости вакцинного штамма холерного вибриона при внутрижелудочном введении взрослым кроликам ..... 37
*Приложение 8.* Определение влияния вакцинных штаммов холерного вибриона на иммунную систему взрослых кроликов ..... 39
*Приложение 9.* Определение стабильности биологических свойств вакцинного штамма холерного вибриона ..... 52
*Приложение 10.* Определение иммуногенности вакцинного штамма холерного вибриона ..... 53
*Приложение 11.* Определение протективной активности вакцинного штамма холерного вибриона ..... 60
*Приложение 12.* Требования к качеству экспериментальных животных ..... 67

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
11 июля 2006 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.3.1. ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

# Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона

## Методические указания МУ 3.3.1.2075—06

## 1. Область применения

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

## 2. Общие положения

Возбудитель холеры относится к особо опасным микроорганизмам II группы патогенности. По данным ВОЗ (2001) наиболее перспективным путем совершенствования специфической профилактики холеры является создание живых оральных холерных вакцин. Потенциально вакцинные штаммы холерных вибрионов должны соответствовать строгим требованиям безопасности и специфической активности. Основной задачей настоящих методических указаний

является изложение обязательных требований к штаммам холерного вибриона – кандидатам для изготовления живых вакцин, критериев оценки и методов исследования, основанных на информативных, хорошо изученных и широко применяемых, официально утвержденных тестах, позволяющих отобрать для последующих клинических испытаний безопасные и высоко иммуногенные штаммы холерного вибриона.

Для изготовления живой вакцины используют штаммы холерного вибриона, стабильно утратившие способность вызывать заболевание, но проявляющие остаточную вирулентность и способность «приживаться» до 3 суток в кишечнике человека и животных (кроликов).

## 3. Порядок проведения работ с вакцинными штаммами холерного вибриона

3.1. Все исследования со штаммами холерного вибриона, перспективными для отбора кандидатов в вакцинные, должны проводиться в «заразной» зоне лабораторий (СП 1.3.1285—03, п. 3.6) в отдельном микробиологическом боксе, где не хранят и не работают с ПБА I—IV групп патогенности. Отобранные авторами штаммы, соответствующие настоящим методическим указаниям, согласно «Классификации патогенных для человека микроорганизмов» (СП 1.2.036—95, прилож. 5.4) переводят в III группу патогенности. Лиофилизацию штаммов – кандидатов в вакцинные для государственных испытаний проводят на изолированном оборудовании и в изолированном помещении, где не хранят и не работают с ПБА I—IV групп патогенности, с вакцинными штаммами или изготавливают живые вакцины.

3.2. Разработчики (учреждения-авторы) передают лиофилизированные в ампулах штаммы – кандидаты в вакцинные (не менее 50 ампул) с отчетом о доклинических испытаниях в Государственную коллекцию патогенных бактерий (ГКПБ) РосНИПЧИ «Микроб» для организации государственных испытаний. Штаммы-кандидаты в вакцинные до завершения всех испытаний (доклинических и клинических) хранят в отдельном холодильнике в помещении лаборатории

ГКПБ, где не проводится работа с ПБА. С момента начала доклинических государственных испытаний штаммы должны быть опечатаны двумя печатями: председателя государственной комиссии (или заместителя председателя) и представителя Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (ответственного за хранение). После завершения доклинических и клинических испытаний и признания штамма вакцинным (приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации) оставшиеся опечатанные ампулы должны быть переданы в Государственную коллекцию ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

3.3. Работу с зашифрованными испытуемым и контрольным эталонным вакцинным (при наличии такого) штаммами проводят как с микроорганизмами III группы патогенности (СП 1.3.1285—03).

3.4. Испытуемый и контрольный вакцинный штамм должны быть зашифрованы перед испытаниями специалистами, не принимающими участия в проведении испытаний.

3.5. Концентрацию клеток в микробных взвесях культур определяют по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-86П 5 единиц, эквивалентных $1{,}1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл или ОСО 42-28-85П 10 единиц, эквивалентных $2{,}2 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл.

3.6. Требования к качеству лабораторных животных приведены в прилож. 12.

## 4. Идентификация штамма по видовым признакам

Возбудителями холеры являются микроорганизмы рода *Vibrio*, вида *cholerae*, серогрупп О1 классического и эльтор биоваров и О139 (табл. 1). К ним относятся грамотрицательные аспорогенные полиморфные палочки прямые или слегка изогнутые с одним полярно расположенным жгутиком, образующие индофенолоксидазу, ферментирующие глюкозу в аэробных и анаэробных условиях, декарбоксилирующие лизин и орнитин, но не расщепляющие аргинин, относящиеся по Хейбергу к 1 ферментативной группе, *V. cholerae* О1, агглютинирующиеся сыворотками холерными О1 и Огава или Инаба до титра или ½ титра, *V. cholerae* О139 – сывороткой до титра.

Методики определяемых показателей биохимических свойств испытуемого штамма с помощью бумажных систем для индикации микроорганизмов (СИБ), микротест-систем для биохимической идентификации вибрионов (МТС-V), микротестсистемы для ускоренного определения групп вибрионов по Хейбергу (МТС-Х); агглютинабельности сыворотками диагностическими холерными О1, Инаба и Огава, RO и О139; лизабельности бактериофагами диагностическими классическим и эльтор, бактериофагами диагностическими холерными эльтор $ctx^+$ и $ctx^-$ изложены в соответствующих Инструкциях по применению препаратов, других дифференциальных признаков – в МУ 4.2.1097—02 «Лабораторная диагностика холеры».

Таблица 1

**Дифференциальные признаки *Vibrio cholerae***

| Признаки | Биовары *V. cholerae* О1 | | *V. cholerae* О139 серогруппы |
|---|---|---|---|
| | Классический | эльтор | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1. Лизабельность холерными фагами: | | | |
| классическим | + | – | – |
| эльтор | – | + | – |
| 2. Агглютинация куриных эритроцитов | – | + | + |
| 3. Чувствительность к 50 ед. полимиксина | + | – | – |
| 4. Образование ацетилметилкарбинола | – | + | + |
| 5. Морфология | изогнутая палочка | | |
| 6. Подвижность | + | | + |
| 7. Окраска по Граму | – | | – |
| 8. Рост на обычных питательных средах | + | | + |
| 9. Индофенолоксидаза | + | | + |
| 10. Образование кислоты из Д-глюкозы в условиях: | | | |
| аэробных | + | | + |
| анаэробных | + | | + |

*Продолжение табл. 1*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| 11. Образование газа из Д-глюкозы | – | | – |
| 12. Лизиндекарбоксилаза | + | | + |
| 13. Орнитиндекарбоксилаза | + | | + |
| 14. Аргининдегидролаза | - | | - |
| 15. Образование кислоты из маннита | + | | + |
| 16. Образование кислоты из инозита | – | | – |
| 17. Образование кислоты из арабинозы | – | | – |
| 18. Образование кислоты из сахарозы | + | | + |
| 19. Образование кислоты из маннозы | + | | + |
| 20. Агглютинабельность сыворотками: | | | |
| холерной О1 | + | | – |
| холерной Инаба или Огава | + | | – |
| холерной RO | – | | – |
| холерной О139 | – | | + |

## 5. Характеристика потенциальной опасности и безвредности штамма

### *5.1. Определение отсутствия функционально полноценного гена, кодирующего синтез холерного токсина*

Основной симптомокомплекс заболевания холерой определяет продуцируемый вибрионом холерный экзотоксин (ХТ). Холерный токсин состоит из двух субъединиц – А и В. Токсические свойства ХТ определяются субъединицей А, иммуногенные свойства – субъединицей В.

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен синтезировать токсин, содержать функционально полноценного гена, кодирующего синтез субъединицы А холерного токсина.

Отсутствие или повреждение гена, кодирующего синтез субъединицы А, должно быть подтверждено с помощью тест-системы для

выявления ДНК *V. cholerae ctxA* методом ПЦР (отрицательный результат в ПЦР). Методика определения приведена в прилож. 1.

### *5.2. Определение отсутствия функционально полноценного гена, кодирующего синтез токсинкорегулируемых пилей адгезии*

Токсинкорегулируемые пили адгезии (ТКПА) участвуют в колонизации тонкого кишечника и являются основным фактором вирулентности возбудителя холеры.

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен синтезировать токсинкорегулируемые пили адгезии, содержать функционально активного гена tcpA, кодирующего синтез основной субъединицы ТКПА, или этот ген должен быть повреждён (отрицательный результат в ПЦР).

Отсутствие или повреждение гена, кодирующего субъединицу ТПКА проверяют с помощью тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae ctxA tcpA* методом ПЦР. Методика определения приведена в прилож. 2.

### *5.3. Определение «остаточной» вирулентности и токсигенности*

Кроме холерного экзотоксина холерный вибрион может продуцировать и некоторые другие токсические субстанции, имеющие, по сравнению с холерным экзотоксином, несравненно меньшее значение в патогенезе инфекции, но способные вызывать в ряде случаев диарейный синдром. Вакцинный штамм должен быть проверен на «остаточную» вирулентность и токсигенность по комплексу тестов *in vivo* и *in vitro*. К числу таких тестов относятся:

*in vivo:*

- определение вирулентности на модели кроликов-сосунков;
- определение «остаточной» токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) в кожной пробе;
- определение «остаточной» токсигенности в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов;

♦ определение «остаточной» токсигенности, реактогенности и приживаемости штамма при внутрижелудочном заражении взрослых кроликов.

*in vitro:*

♦ определение вирулентности по лизису бактериофагами диагностическими холерными эльтор $ctx^+$ и $ctx^-$ и гемолитической активности.

### *5.3.1. Определение «остаточной» вирулентности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков*

Вакцинный штамм должен быть авирулентным при введении в петлю тонкого кишечника крольчат-сосунков в дозах $10^5$ и $10^7$ вибрионов в объеме 0,2 мл: не вызывать заболевания, гибели крольчат и макроскопических изменений в кишечнике. Вакцинные штаммы холерного вибриона не должны вызывать у крольчат развитие энтеропатогенного синдрома, связанного с реализацией других факторов патогенности.

Определение вирулентности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков проводят по методике, изложенной в МУ 4.2.1097—02 «Лабораторная диагностика холеры» и в прилож. 3.

### *5.3.2. Определение лизиса холерных эльтор вибрионов бактериофагами диагностическими холерными эльтор $ctx^+$ и $ctx^-$ и гемолитической активности*

Вакцинный штамм *V. cholerae eltor* по лизабельности бактериофагами диагностическими холерными эльтор $ctx^+$ и $ctx^-$ должен быть эпидемически неопасным (авирулентным): не должен лизироваться бактериофагом диагностическим холерным эльтор $ctx^+$, может лизироваться или не лизироваться бактериофагом $ctx^-$; может быть гемолизположительным или гемолизотрицательным.

Определение вирулентности холерных вибрионов эльтор по лизису бактериофагами $ctx^+$ и $ctx^-$ проводят в соответствии с Инструкцией по их применению, гемолитической активности – согласно МУ 4.2.1097—02 «Лабораторная диагностика холеры» (табл. 2).

Таблица 2

**Схема оценки эпидемической значимости (вирулентности) холерных эльтор вибрионов по тесту с бактериофагами *ctx*$^+$ и *ctx*$^-$ и гемолитической активности в соответствии с инструкцией по применению бактериофагов**

| Группы | Варианты | Гемолиз по Грейгу | Чувствительность к фагам | | Оценка эпидемиологической значимости |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | *ctx*+ | *ctx*$^-$ | |
| I | 1 | – | + | – | эпидемически опасны |
| II | 2 | – | – | – | для оценки эпидемической значимости необходимы дополнительные исследования на наличие генов *ctx*AB, *tcp*A или токсигенности на крольчатах-сосунках |
| | 3 | – | + | + | |
| | 4 | + | + | + | |
| | 5 | + | + | – | |
| III | 6 | + | – | + | эпидемически неопасны |
| | 7 | + | – | – | |
| | 8 | – | – | + | |

### *5.3.3. Определение «остаточной» токсигенности в кожной пробе*

Вакцинный штамм должен быть нетоксигенным в кожной пробе – не вызывать кожной реакции в виде папул размером более 6 мм и зоны некроза 2 мм и более при внутрикожном введении взрослым кроликам по 0,1 мл взвеси вибрионов, содержащей в 1 мл $5 \times 10^8$ и более вибрионов.

Методика определения «остаточной» токсигенности штаммов холерного вибриона по выявлению фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора в кожной пробе на взрослых кроликах приведена в прилож. 4.

*5.3.4. Определение безвредности и «остаточной» токсигенности исследуемого штамма холерного вибриона при внутрикишечном введении кроликам-сосункам*

Штаммы холерного вибриона, кандидаты в вакцинные, при внутрикишечном пассировании на крольчатах в дозе $1 \times 10^7$ вибрионов в объеме 0,2 мл не должны вызывать гибели животных или заболевания с проявлением диареи и скоплением жидкости в просвете тонкого и толстого кишечника (холерогенный синдром).

Методика определения безвредности и «остаточной» токсигенности холерного вибриона при внутрикишечном заражении кроликов-сосунков приведена в прилож. 5.

*5.3.5. Определение «остаточной» токсигенности испытуемого штамма в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов*

Вакцинный штамм холерного вибриона при введении в лигированную петлю тонкого кишечника взрослого кролика массой 2,5—3 кг в дозах $1 \times 10^7$ и $1 \times 10^9$ вибрионов в объеме 1 мл не должен вызывать макроскопических изменений в петле кишечника, отличных от изменений в петле, в которую вводили 0,9 %-й раствор натрия хлорида. Объем жидкости в петлях с вакцинным штаммом не должен превышать объем в петлях с физиологическим раствором.

Методика определения «остаточной» токсигенности холерного вибриона в лигированных петлях взрослых кроликов приведена в прилож. 6.

*5.3.6. Определение безвредности, «остаточной» токсигенности и приживаемости исследуемого штамма при внутрижелудочном введении взрослым кроликам*

Вакцинный штамм холерного вибриона при внутрижелудочном введении взрослым кроликам в дозах $5 \times 10^7$, $5 \times 10^9$ и $5 \times 10^{10}$ вибрионов не должен вызывать гибели животных. В посевах органов животных может наблюдаться рост холерного вибриона только из содержимого желудка, кишечника, желчного пузыря не дольше 28 дней с момента введения.

У взрослых кроликов массой 2,5—3 кг не должна развиваться диарея. В просвете кишечника должно быть минимальное количество обычного по консистенции содержимого (прилож. 7).

*5.3.7. Определение реактогенности штамма по прижизненным наблюдениям при внутрижелудочном введении взрослым кроликам*

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен вызывать значительных прижизненных реактивных изменений у кроликов. Дозы $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов не должны вызывать повышения температуры и снижения массы тела животного в течение 10 суток. В ответ на введение дозы $5 \times 10^{10}$ м.к. вакцинного штамма холерного вибриона у кроликов в течение пяти дней допустимо снижение массы тела. К 6—7 суткам после введения испытуемой культуры снижение массы животных не должно превышать 1/5 его первоначальной величины. Повышение температуры не должно быть выше, чем на 1—1,5 °С (прилож. 7).

*5.3.8. Определение безвредности штамма по морфологическим показателям*

5.3.8.1. Морфологические изменения у кроликов-сосунков при внутрикишечном введении им исследуемого штамма холерного вибриона

Допустимо небольшое полнокровие серозной оболочки тонкого кишечника в области введения испытуемого штамма холерного вибриона.

При гистологическом исследовании толстого и тонкого кишечника допускается незначительный отек стромы ворсинок и их полнокровие, незначительная вакуолизация покровного эпителия и небольшое увеличение размеров бокаловидных клеток. В паренхиматозных внутренних органах допустимо развитие умеренных компенсаторных дистрофических изменений (зернистая дистрофия) и умеренное полнокровие.

Недопустимы резкое полнокровие стенки толстого и тонкого кишечника, резкий отек слизистой и подслизистой оболочек, наличие кровоизлияний, массивные некрозы покровного эпителия и рез-

ко выраженные дистрофические изменения во внутренних органах. Недопустимы морфологические признаки развития генерализации инфекционного процесса, обусловленного испытуемым штаммом холерного вибриона и обострением скрытой инфекции (прилож. 5).

5.3.8.2. Морфологические изменения у взрослых кроликов при введении в лигированные петли тонкого кишечника

Недопустимо развитие более выраженного, чем в контроле отека слизистой и подслизистой оболочек, наличие кровоизлияний и некроза покровного эпителия ворсин. Расстройства кровообращения стенок тонкого кишечника не должны превышать подобные изменения в контроле.

Методика определения токсигенности холерного вибриона в лигированных петлях взрослых кроликов приведена в прилож. 6.

5.3.8.3. Морфологические изменения у взрослых кроликов при внутрижелудочном введении исследуемого штамма холерного вибриона

Макроскопическая картина. На серозной и в слизистой оболочках кишечника не должно быть кровоизлияний. Поверхность слизистой оболочки кишечника должна выглядеть бархатистой без признаков воспаления. Пейеровы бляшки не должны быть редуцированы. Во внутренних органах недопустимо развитие резких дистрофических изменений паренхиматозных элементов (доходящих до стадии некроза), недопустимы резкие расстройства кровообращения (значительный отек, кровоизлияния).

Допустимые гистологические изменения. Умеренное полнокровие внутренних органов, слизистой и подслизистой оболочек толстого и тонкого кишечника, небольшая инфильтрация стромы ворсинок мононуклеарами. Умеренное увеличение количества бокаловидных клеток в эпителиальном пласте слизистой оболочки тонкого кишечника. Умеренные гиперпластические процессы в лимфоидной ткани кишечника и вторичных лимфоидных органах. Умеренные дистрофические изменения паренхиматозных органов.

Недопустимые гистологические изменения. Выраженное полнокровие и стаз крови в расширенных сосудах миокарда, почек, печени, легких. Значительные дистрофические процессы в печени, вплоть до

дискомплексации печеночных балок. В почках – зернистая дистрофия, доходящая до гибели эпителиальных клеток извитых канальцев. Резкое полнокровие, микроскопические кровоизлияния в корковом и мозговом слоях надпочечников с гибелью клеточных элементов. Резкий отек стромы ворсинок и подслизистого слоя в тонком кишечнике. Значительные полиморфно-клеточные инфильтраты (включающие нейтрофилы, эозинофилы и гистиоциты) в строме ворсинок и подслизистом слое. Резкая инфильтрация покровного эпителия кишечника лимфоидными элементами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. Значительный отек подслизистой оболочки толстого кишечника с наличием выраженной вакуолизации покровного эпителия. Заметное обеднение лимфоидной ткани, связанной с кишечником (пейеровые бляшки, аппендикс, круглый мешочек), лимфоцитами. Резкая редукция лимфатических фолликулов селезенки.

Методика определения токсигенности, безвредности, реактогенности и приживаемости холерного вибриона при внутрижелудочном введении взрослым кроликам приведена в прилож. 7.

### *5.4. Определение влияния на иммунную систему*

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

Испытуемый штамм холерного вибриона при внутрижелудочном введении не должен приводить к нарушению иммунологического гомеостаза организма, т. е. испытуемый штамм не должен статистически достоверно снижать усредненные иммунологические показатели, по сравнению с исходным усредненным уровнем и (или) уровнем в контрольных группах до введения препарата.

Методы исследования влияния штамма на иммунную систему в соответствии с РД 42-28-10-90 и «Медицинскими лабораторными технологиями» (Справочник, 2002) приведены в прилож. 8. Взрослых кроликов для этих опытов используют тех же, что и для опреде-

ления безвредности, «остаточной» токсигенности, реактогенности и приживаемости вакцинного штамма (прилож. 7) и протективной активности (прилож. 11).

*5.4.1. Определение количества Т-лимфоцитов в крови кроликов*

Вакцинный штамм не должен вызывать статистически достоверного уменьшения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в крови кроликов, иммунизированных внутрижелудочно дозами $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов. Увеличение количества Т-лимфоцитов свидетельствует об иммунологической активности испытуемого и контрольного штаммов холерного вибриона.

*5.4.2. Определение количества В-лимфоцитов в крови кроликов*

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен вызывать в крови статистически достоверного снижения абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов у кроликов, привитых внутрижелудочно дозами $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов. Увеличение количества В-лимфоцитов свидетельствует об иммунологической активности испытуемого штамма.

*5.4.3. Определение фагоцитарной активности макрофагов*

Фагоцитарная активность макрофагов оценивается по следующим показателям: процент фагоцитирующих клеток (ПФ) и фагоцитарное число – количество микробных клеток на один фагоцит (ФЧ).

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен оказывать повреждающего действия на иммунную систему кроликов, привитых внутрижелудочно дозами $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов, должен стимулировать фагоцитирующие мононуклеары перитонеального экссудата – повышать процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарное число.

*5.4.4. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) спонтанная и под влиянием Т- и В-митогенов*

Реакцию бласттрансформации клеток оценивают по уровню радиометрической метки и выражают в виде индекса стимуляции клеток (ИС), представляющего собой частное от деления среднеарифметического количества импульсов в 1 мин в культурах лимфоцитов,

стимулированных митогеном, на среднеарифметическое количество импульсов в 1 мин в контрольных, не стимулированных митогенами клетках.

Вакцинный штамм холерного вибриона не должен оказывать повреждающего действия на иммунную систему кроликов, привитых внутрижелудочно $5 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл – не должен снижать значение ИС РБТЛ; у кроликов, привитых дозой $5 \times 10^7$ вибрионов в 1 мл, должен стимулировать функциональную активность Т- и В-лимфоцитов – вызывать статистически значимое повышение ИС РБТЛ.

### *5.4.5. Определение поликлональной активности В-лимфоцитов*

Для оценки этого показателя определяют число клеток, продуцирующих антитела к эритроцитам барана (АОК), методом локального гемолиза в геле в разные сроки (3, 7, 14 и 28 сут.) после внутрижелудочного введения испытуемого штамма взрослым кроликам массой 2,5—3 кг.

Вакцинный штамм холерного вибриона у кроликов, привитых внутрижелудочно дозами $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов, не должен вызывать длительного повышения поликлональной активности В-лимфоцитов. Введение вакцинного штамма холерного вибриона может вызывать на 3—7 сут. статистически достоверное повышение поликлональной активности В-лимфоцитов, нормализация показателей должна наступать к 28 суткам.

### *5.4.6. Исследование иммунореактивности на гетерологичный антиген*

Влияние вакцинного штамма холерного вибриона на развитие иммунного ответа на гетерологичный антиген оценивают по формированию АОК в ответ на эритроциты барана (ЭБ) – гетерологичный Т-зависимый антиген.

Вакцинный штамм холерного вибриона у кроликов, привитых внутрижелудочно дозами $5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл, не должен вызывать вторичное иммунодефицитное состояние – не должен снижать иммунный ответ на гетерологичный антиген.

## 6. Генетическая стабильность вакцинных штаммов

Вакцинные штаммы холерного вибриона не должны реверсировать в вирулентную форму, способную вызывать в организме изменения, характерные для холерной инфекции. Вакцинный штамм после 10 пассажей через организм крольчат-сосунков и пересевов на жидких и плотных питательных средах не должен усиливать свои патогенные свойства и должен сохранять стабильность генома.

Методы определения генетической стабильности вакцинного штамма холерного вибриона приведены в прилож. 9.

## 7. Характеристика иммунологической активности вакцинного штамма

7.1. Вакцинный штамм холерного вибриона должен вызывать у взрослых кроликов, привитых внутрижелудочно через зонд дозами $5 \times 10^7$, $5 \times 10^9$ и $5 \times 10^{10}$ вибрионов в 1 мл, накопление в сыворотке крови вибриоцидных, агглютинирующих и антитоксических антител, в слизистой оболочке тонкого кишечника – копроантител в статистически достоверных по сравнению с контролем количествах.

У привитых указанными дозами вакцинного штамма кроликов должны увеличиваться титры вибриоцидных, агглютинирующих и антитоксических антител по сравнению с их значениями до вакцинации не менее чем в 2 раза, копроантитела должны обнаруживаться у всех привитых кроликов.

Методы определения иммунологической активности вакцинного штамма холерного вибриона приведены в прилож. 10.

## 8. Определение протективных свойств вакцинного штамма на взрослых кроликах

8.1. У взрослых кроликов, иммунизированных внутрижелудочно дозой $5 \times 10^9$ вибрионов испытуемого штамма, при введении $1 \times 10^6$ м.к. вирулентного штамма в лигированную петлю через 14 сут. после их иммунизации должно наблюдаться статистически достоверное по сравнению с контролем снижение адгезии вирулентных клеток.

Методика определения приведена в прилож. 11.

8.2. Предварительная внутрижелудочная иммунизация через зонд взрослых кроликов испытуемым штаммом в дозе $5 \times 10^9$ вибрионов должна давать статистически достоверный протективный эффект в сравнении с интактными (не иммунизированными) животными при их заражении вирулентным штаммом с помощью RITARD – техники (RITARD модель). Методика определения протективной активности вакцинного штамма приведена в прилож. 11.

Чем выше протективная активность испытуемого штамма, тем больше должна быть величина $LD_{50}$ вирулентного штамма для иммунизированных животных.

8.2.1. Введение $5 \times 10^9$ м.к. испытуемого штамма взрослым кроликам внутрижелудочно через зонд должно способствовать более быстрому (к 4—6 сут.) по сравнению с контролем освобождению организма кроликов от заражающего вирулентного штамма холерного вибриона (по результатам прижизненного посева ректального содержимого; бактериологического исследования содержимого тонкого и толстого кишечника погибших и умерщвленных животных).

8.2.2. Индекс иммунитета (ИИ) испытуемого штамма – отношение величины $LD_{50}$ вирулентного штамма для иммунизированных животных к величине $LD_{50}$ для контрольных животных не должен быть меньше 15.

## 9. Изучение стабильности штамма в производственных условиях

Испытуемый штамм, соответствующий по результатам доклинических испытаний требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам холерного вибриона, проверяют в производственных условиях.

Вакцинные штаммы холерного вибриона не должны изменять свои культурально-морфологические, биохимические, серологические, генетические и иммуногенные свойства в процессе культивирования в производственных условиях; должны обеспечивать хорошую урожайность, жизнеспособность и стабильность биомассы. Препарат, приготовленный из испытуемого штамма, не должен уступать по качеству разрешенной к применению вакцине.

## 10. Заключение

Признание испытуемого штамма холерного вибриона в качестве вакцинного оформляется приказом Министра здравоохранения и социального развития Российской Федерации на основании заключения Федерального комитета по медицинской этике, Национального органа контроля ГИСК им. Л. А. Тарасевича и решения Комитета медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП).

Испытуемый штамм, удовлетворяющий настоящим методическим указаниям по всем свойствам, может быть допущен до следующего этапа внедрения – клиническим испытаниям на людях. Разрешение на изготовление экспериментально-производственных серий живой вакцины из нового штамма и проведение клинических ограниченных, а затем государственных испытаний на добровольцах в соответствии с Санитарными правилами «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов» (СП 3.3.2.561—96. М., 1998) дает Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации по представлению Комитета МИБП и Федерального комитета по медицинской этике.

## Библиографические данные

1. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан.

2. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.99 № 52-ФЗ.

3. Методические указания «Основные критерии оценки вакцинных штаммов холерного вибриона», утверждены Госкомсанэпиднадзором России 17.10.94 № 01-19/48-11.

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

5. «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения» РД 42-28-8—89.

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

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

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

9. Справочник «Медицинские лабораторные технологии». С.-Пб., 2002.

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

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

12. «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами» СП 1.2.731—94.

**Приложение 1**
(обязательное)

## Определение отсутствия у вакцинного штамма холерного вибриона гена, кодирующего синтез А-субъединицы холерного токсина методом ПЦР

Отсутствие гена, кодирующего А-субъединицу холерного токсина, определяют с помощью тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae ctx* $A^+$ методом полимеразной цепной реакции (ФСП 42-0020-3806—03) в соответствии с инструкцией по применению и с помощью тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae ctx A tcp A с* праймерами № 1 и № 2 (прилож. 2).

1. *Подготовка испытуемого и контрольного штаммов холерного вибриона.* Для получения микробной взвеси испытуемого и контрольного штаммов, в качестве которого используют штамм *V. cholerae* 569B ctx $A^+$ ампулы с лиофилизированными культурами стерильно вскрывают и вносят в них 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида мерной пипеткой емкостью 1—2 мл II класса точности. После растворения микробную взвесь в объеме 0,1 мл засевают с помощью этой пипетки в 1 %-ю пептонную воду (ФСП 42-0010-2040—01 или ФСП 42 0026-2128—01), инкубируют в течение 3—6 ч при температуре (37 ± 1) °С. Затем производят высев с помощью бактериальной петли № 2 на агар Хоттингера (МУК 4.1/4.2.588—96. С. 46) pH 7,6 ± 0,1, инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—20 ч.

2. *Получение ДНК.* Взвесь односуточной культуры изучаемого и контрольного штаммов, выращенных на агаре Хоттингера pH 7,6 ± 0,1, готовят в 2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида по стандартному образцу мутности 5 единиц (ОСО 42-28-86П), что соответствует $1{,}1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл. Затем делают 10-кратные разведения взвесей (0,5 мл взвеси и 4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида) до концентрации $1 \times 10^5$, $1 \times 10^4$ и $1 \times 10^3$ м. к. / мл. Количество клеток проверяют высевом 0,1 мл из разведения с концентрацией $1 \times 10^3$ м. к. / мл на агар Хоттингера pH 7,6 ± 0,1. Через 24 ч инкубации в термостате при температуре (37 ± 1) °С подсчитывают количество выросших колоний (на агаровых пластинках должно вы-

растать не менее 30 колоний) и количество м. к./мл культуры, умножив полученную величину на разведение.

Обеззараживание культуры проводят согласно МУ 3.5.5.1034—01 (п. 5.1.1) добавлением к микробной взвеси, содержащей $1 \times 10^9$, $1 \times 10^5$ и $1 \times 10^4$ м. к. в 1 мл 0,1 %-го раствора мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 % (1 : 10 000) и прогревают на водяной бане при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин согласно п. 5.1.1 МУ 3.5.5.1034—01. После этого работа может проводиться как с обеззараженным материалом.

3. *Выделение ДНК.* 1 мл обеззараженной бактериальной взвеси переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 8 000 g – в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 50 мкл стерильной деионизованной воды, лизируют на кипящей водяной бане в течение 10 мин и центрифугируют при 8 000 g в течение 1 мин. Супернатант в количестве 10 мкл используют для проведения ПЦР.

4. *Проведение полимеразной цепной реакции.* Проведение и учет полимеразной цепной реакции проводят в соответствии с Инструкцией по применению на тест-систему диагностическую для выделения ДНК *Vibrio cholerae ctxA* методом полимеразной цепной реакции.

**Приложение 2**
(обязательное)

## Определение отсутствия у вакцинного штамма холерного вибриона функционально полноценного гена, кодирующего синтез токсинкорегулируемых пилей адгезии, методом ПЦР

Токсинкорегулируемые пили адгезии (ТКПА) являются основным фактором колонизации тонкого кишечника.

Отсутствие гена, кодирующего синтез токсинкорегулируемых пилей адгезии, определяют с помощью тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae ctxA tcpA* методом полимеразной цепной реакции, производства Научно-исследовательского института микробиологии Министерства обороны Российской Федерации.

### 1. Подготовка растворов и реагентов

1.1. *Буферный раствор для электрофореза* pH 8,3 готовят в колбе на 1 л (ГОСТ 1770—74Е) по следующей прописи:

трис-HCl (ТУ 6-09-2477—88) –14 г;
борная кислота (ГОСТ 9656—95) –5,5 г;
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль, ГОСТ 10652—73) –0,93 г;
этидия бромид (Serva, Германия) –0,5 г.

Буферный раствор хранят в темной полипропиленовой посуде при температуре (4 ± 2) °С до 30 сут.

1.2. *Буфер для нанесения ПЦР-проб на гель.* 0,025 г бромфенолового синего (ТУ-6-09-1058—86), 0,7 г сахарозы (ГОСТ 5833—95) и 0,5 г глицерина (ГОСТ 6259—95) помещают в химический стакан на 25 мл (ГОСТ 25336—82Е), растворяют в 5 мл дистиллированной воды, после чего доводят общий объем раствора до 10 мл дистиллированной водой. Буфер хранят в стеклянной посуде при температуре 18—22 °С до 3 мес.

1.3. *0,9 %-й раствор натрия хлорида.* Навеску 9 г натрия хлорида (ГОСТ 4233—77) помещают в мерную колбу на 1 л (ГОСТ 1770—74Е), добавляют 100 мл дистиллированной воды. После полного

растворения доводят дистиллированной водой до 1 л. Раствор фильтруют, устанавливают с помощью натрия двузамещенного фосфорнокислого pH 7,2 ± 0,1, разливают во флаконы (ГОСТ 10782—77) и стерилизуют при (120 ± 2) °С в течение 30 мин. Раствор хранят при температуре 18—22 °С до 3 мес.

1.4. *0,1 %-й раствор натрия мертиолята.* Навеску натрия мертиолята 0,1 г помещают в мерную колбу на 100 мл (ГОСТ 1770—74Е), добавляют 50 мл дистиллированной воды, после полного растворения соли доводят дистиллированной водой до 100 мл. Оценку качества раствора натрия мертиолята проводят по МУК 4.1/4.2.588—96. С. 105.

## 2. Подготовка испытуемого и контрольных штаммов холерного вибриона

2.1. Для получения микробной взвеси испытуемого и контрольных штаммов, в качестве которых используют штаммы *V. cholerae* 569B *ctxA tcpA* классического биовара и *V. cholerae* M-1273 *ctxA tcpA* биовара эльтор, ампулы с лиофилизированными культурами стерильно вскрывают и вносят в них 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида мерной пипеткой емкостью 1—2 мл II класса точности по ГОСТ 20292—74. После растворения каждую микробную взвесь в объеме 0,1 мл засевают с помощью этой же пипетки в бульон Хоттингера pH 7,6 ± 0,1 и инкубируют в течение 3—6 ч при температуре (37 ± 1) °С. Затем производят высев с помощью бактериальной петли № 2 на агар Хоттингера pH 7,6 ± 0,1 и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—20 ч.

2.2. *Получение ДНК.* Взвесь односуточной культуры изучаемого и контрольных штаммов, выращенных на агаре Хоттингера pH 7,6 ± 0,1, готовят в 2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида по стандартному образцу мутности 5 единиц (ОСО 42-28—86П), что соответствует $1,1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл. Затем делают 10-кратные разведения взвесей (0,5 мл взвеси и 4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида) до концентрации $1 \times 10^5$, $1 \times 10^4$ и $1 \times 10^3$ м. к./мл. Количество клеток проверяют высевом 0,1 мл из разведения с концентрацией $1 \times 10^3$ м.к./мл на агар Хоттингера pH 7,6 ± 0,1. Через 24 ч инку-

бации в термостате при температуре (37 ± 1) °С подсчитывают количество выросших колоний (на агаровых пластинках должно вырастать не менее 30 колоний) и количество м. к. в 1 мл культуры, умножив полученную величину на разведение.

Для обеззараживания микробных взвесей, содержащей $1 \times 10^5$,$1x10^4$ и $1 \times 10^3$ м. к. / мл, добавляют 0,1 %-й раствор мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 % (1 : 10 000) и прогревают на водяной бане при температуре (56 ± 1) °С в течение 30 мин согласно МУ 3.5.5.1034—01 (п. 5.1.1). После этого работа может проводиться как с обеззараженным материалом.

2.3. *Выделение ДНК.* Выделение ДНК следует проводить в соответствии с п. 4 прилож. 1.

### 3. Проведение полимеразной цепной реакции

Исследование приготовленной пробы с праймерами № 1 и № 2 (обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 302 п. н., соответствующего нуклеотидной последовательности структурного гена ctxA), № 3, № 4 и № 5 (обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 455 п. н. для *V. cholerae* O1 биовара эльтор и *V. cholerae* O139, а также размером 264 п.н. для *V. cholerae* O1 классического биовара) проводят параллельно в отдельных пробирках.

Реактивы для проведения реакции извлекают из морозильника и полностью размораживают при комнатной температуре.

Для проведения амплификации ДНК используют микроцентрифужные пробирки объемом 0,6 мл (полипропиленовые, «QSP», США). Пробу ставят в трех повторностях. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками («Ленпипет», РФ) с помощью автоматических микропипеток на 10, 40 и 200 мкл («Лабсистем-Ленпипет», РФ).

Готовят смесь компонентов для анализа в микроцентрифужных пробирках с праймерами № 1 и № 2 из расчета на одну пробу в следующей последовательности: $H_2O$ деионизированную – 12,5 мкл, 10 × Б – 2,5 мкл, дНТФ – 2,5 мкл, раствор праймеров (№ 1, № 2) – 2 мкл, Taq-полимераза – 0,5 мкл. После добавления всех компонен-

тов реакционную смесь тщательно перемешивают путем пипетирования и разливают по 20 мкл в микропробирки объемом 0,5 мл. В микропробирку с отрицательным контролем добавляют вместо ДНК-пробы по 5 мкл деионизированной воды. В пробирки с положительным контролем добавляют по 5 мкл раствора ДНК, разведенного в 10, 100, и 1 000 раз (выделенного из контрольных штаммов холерного вибриона в дозах $1 \times 10^3$, $1 \times 10^4$ м. к./мл). В остальные микропробирки добавляют по 5 мкл раствора ДНК, выделенного из испытуемого штамма холерного вибриона в дозах $1 \times 10^3$, $1 \times 10^4$ и $1 \times 10^9$ м. к./мл. На поверхность смеси наслаивают 30 мкл вазелинового масла. Общий объем реакционной смеси во всех микропробирках должен составлять 25 мкл. Микропробирки закрывают.

Смесь компонентов для анализа с праймерами № 3, № 4 и № 5 готовят аналогично описанному выше для праймеров № 1 и № 2 с тем отличием, что вместо праймеров № 1 и № 2 вносят праймеры № 3, № 4 и № 5.

Микропробирки помещают в ячейки рабочей камеры программируемого термостата (амплификатор «Терцик МС-2», РФ). Перед началом амплификации ДНК в исследуемых пробах денатурируют при температуре (94 ± 0,1) °С в течение 5 мин. Затем проводят 35 циклов ПЦР. Каждый цикл амплификации включает в себя денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 1 мин, гибридизацию праймеров на ДНК-матрице при температуре 51 °С (при анализе с праймерами № 1 и № 2) или 53 °С (при анализе с праймерами № 3, № 4 и № 5) в течение 1 мин, синтез комплементарной цепи ДНК при температуре 72 °С в течение 1 мин. После последнего цикла пробирки прогревают в течение 10 мин при температуре (72 ± 0,1)°С.

4. *Постановка гель-электрофореза.* Продукты ПЦР анализируют методом гель-электорфореза в 2 %-й агарозе в аппарате типа ПГ-9 или «Sub-Cell GT» (BIO-RAD, США) с блоком питания и набором штампов для подготовки геля.

4.1. Для подготовки 2 %-го агарозного геля используют буферный раствор для электрофореза: к 2 г агарозы («Серва», Германия, или «SIGMA», США) добавляют 100 мл буферного раствора для электрофореза. Смесь в термостойкой колбе нагревают в кипящей водяной бане до полного растворения агарозы, охлаждают до темпе-

ратуры 50 °С и выливают на подготовленный столик аппарата типа ПГ-9 или «Sub-Cell GT» для заливки геля с установленной гребенкой для формирования лунок. Размеры столика соответственно (9 × 13) см или (10 × 15) см; высота слоя геля, образующегося при указанных условиях – 4 мм. С помощью специального штампа «гребенки» на катодном конце геля формируют лунки для нанесения проб. Между дном лунки и основанием геля должен оставаться слой агарозы 0,5—1,0 мм. Гребенку осторожно удаляют, платформу с гелем устанавливают в прибор для электрофореза.

Буферные емкости аппарата ПГ-9 заполняют ТАЕ буфером – 500 мл, при этом он покрывает гель слоем 3—5 мм, а аппарата «Sub-Cell GT» – слоем буфера 2—3 мм.

4.2. *Проведение гель-электрофореза.* К 20 мкл амплифицированного продукта добавляют 3 мкл буферного раствора для нанесения проб. Образцы вносят с помощью автоматической микропипетки переменного объема от 20 до 40 мкл в лунки геля под буферный раствор для электрофореза. Электрофорез проводят при градиенте напряжения 10 В/см в течение 1 ч, пока красителю остается пройти до анодного края геля не менее 2 см.

Окрашенную бромистым этидием ДНК в геле просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют УФ трансиллюминатор «LKB 2011» фирмы «LKB» (Швеция) или трансиллюминатор «ФЛУСКОП-2» («Диа-М», Россия) с длиной волны 305 нм. Гель фотографируют в проходящем свете на фотопленку «Микрат-300» или «ФР-64» («Тасма», РФ) и сканируют с использованием документирующей системы Gel Doc 1000 (BIO-RAD, США).

4.3. *Учет результатов ПЦР.* Результаты оцениваются по отсутствию или наличию у испытуемого штамма фрагментов ДНК, полосы которых располагаются в геле на том же уровне, что и полосы у положительных контролей. В положительном контроле с контрольным препаратом ДНК из клеток *V. cholerae* 569В классического биовара и *V. cholerae M-] 273* биовара эльтор в концентрации $10^4$ и $10^3$ м. к. / мл при использовании праймеров № 1 и № 2 должен присутствовать один фрагмент (полоса) величиной 302 п. н., соответствующий нуклеотидной последовательности структурного гена ctxA, ответственного за синтез субъединицы А холерного токсина. В по-

ложительном контроле при использовании праймеров № 3, № 4 и № 5 должны быть видны два фрагмента ДНК размером 455 п.н. (для *V. cholerae* O1 биовара эльтор и O139) и 264 п. н. (для *V. cholerae* O1 классического биовара), соответствующие нуклеотидным последовательностям структурного гена tcpA, ответственного за синтез основной субъединицы пилей адгезии. Отсутствие продукта реакции оценивается как отрицательный результат.

Вакцинный штамм холерного вибриона в концентрации $1 \times 10^5$, $1 \times 10^4$, $1 \times 10^3$ м. к./мл не должен давать полосы в геле, идентичные положительным контролям.

**Приложение 3**
(обязательное)

## Определения «остаточной» вирулентности холерных вибрионов на модели кроликов-сосунков

Для заражения используют 4-часовую культуру испытуемого штамма, выросшую при температуре (37 ± 1) °С. Штамм засевают в пробирку с 5 мл 1 %-й пептонной воды (ФСП 42-0010-2040—01, ФСП 42-0026-2128—01 или ФС 42-3040—98), выращивают при температуре (37 ± 1) °С в течение 3—4 ч, после чего производят пересев на чашки Петри со щелочным агаром (ФСП 42-0010-2989, ФСП 42-0026-2132—01 или ФС 42-3405—97). После 18—20 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С культуру отсевают на свежеприготовленные и не подсушенные пластинки со щелочным агаром в чашках Петри, инкубируют 3—4 ч при температуре (37 ± 1) °С и используют для заражения. Взвесь вибрионов готовят в 0,9 %-м растворе натрия хлорида концентрацией $1{,}1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-86П 5 единиц, эквивалентному $1{,}1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл. Кроликам-сосункам массой 10—12 г вводят три дозы $10^5$, $10^7$ вибрионов в объеме 0,2 мл внутрикишечно. Каждой дозой заражают двух кроликов-сосунков. Для заражения используют свежеприготовленные взвеси. Заражающую дозу контролируют путем высева на две пластинки щелочного агара в чашках Петри по 0,1 мл взвеси из разведения, содержащего $1 \times 10^3$ вибрионов в 1 мл.

Крольчат два раза в сутки кормят молоком, закапывая его в рот шприцом без иглы.

*Инструменты и материалы, необходимые для заражения:*

- две малые стеклянные воронки с ватными тампонами для эфирного наркоза;
- глазной пинцет, два больших пинцета (анатомический и хирургический), ножницы (большие и малые), скальпель, два хирургических зажима, 5—6 хирургических игл № 3—4;
- шелк хирургический в спирте;
- скобки Мишеля (в спирте);

- эфир, спирт, 5 %-я настойка йода;
- марлевые салфетки и тампоны;
- туберкулиновые или однокубиковые шприцы с иглами.

*Техника операции*

Кроликов в возрасте 10—12 дней, массой 130—160 г фиксируют к станку брюшком вверх, выстригают шерсть на операционном поле и смазывают его раствором йода. Дают эфирный наркоз или внутримышечно тиопенталовый наркоз (0,2 мл 1 %-го раствора ни 100 г массы). Животное покрывают стерильной салфеткой с разрезом в центре. Стерильными ножницами или скальпелем делают разрез по средней линии живота на уровне пупка длиной 1 см, отсепаровывают кожу пинцетом, делают небольшой разрез брюшной стенки. Извлекают петлю тонкого кишечника (на длинной брыжейке), которую фиксируют с помощью хирургического пинцета. В просвет кишки шприцем вводят 0,2 мл взвеси, содержащей $10^5$ или $10^7$ вибрионов, петлю погружают в брюшную полость. Послойно зашивают брюшную стенку и кожу (на разрез кожи можно наложить скобки Мишеля). Шов смазывают йодом. Все манипуляции выполняют с соблюдением правил асептики. Оперированных животных кормят с помощью шприца и других приспособлений молоком и наблюдают за ними в течение 48 ч.

*Учет результатов*

У кроликов регистрируют общее состояние (подвижность, отсутствие взъерошенной шерсти и судорог), отсутствие признаков диареи (жидкие каловые массы на задних лапках и в области анального отверстия, брюшка или грудной части туловища). Всех погибших или умерщвленных через 48 ч животных вскрывают, внутренние органы подвергают морфологическому исследованию и производят высев содержимого тонкого и толстого кишечника на питательный щелочной агар. Выросшую культуру холерного вибриона идентифицируют с помощью реакции агглютинации на стекле с сывороткой диагностической холерной О1 или О139.

Во время вскрытия обращают внимание, в первую очередь, на сухость тканей и изменения со стороны желудочно-кишечного трак-

та. Вакцинный штамм не должен вызывать синдрома энтеропатогенности (холерогенности): не должно быть выраженных изменений в толстом кишечнике, петли кишечника не должны быть растянуты жидкостью (бесцветной, светло-желтой или мутной коричнево-желтой). Жидкость из кишечника перенести в пробирку.

Во время вскрытия из органов и тканей берут материал для гистологического исследования.

Авирулентные вибрионы не вызывают заболевания, гибели кроликов-сосунков и макроскопических изменений в кишечнике.

**Приложение 4**
(обязательное)

## Определение «остаточной» токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) холерного вибриона в кожной пробе на взрослых кроликах

Исследуемую культуру вначале высевают на щелочной мясопептонный агар pH 7,4—7,6 и инкубируют 18—20 ч при температуре 37 °С. Затем колонии в S-форме пересевают в 3 %-ю пептонную воду с 0,5 % натрия хлорида pH 7,6. Через 4 ч выращивания 0,2 мл бульонной культуры высевают на поверхность агара, покрытого целлофановой пленкой. Чашки с посевами крышкой вверх инкубируют при температуре 37 °С в течение 18—20 ч. Выросшую культуру холерных вибрионов смывают с поверхности целлофана 2,5 мл забуференного 0,9 %-го раствора натрия хлорида и переносят в стерильную пробирку.

Для определения токсигенности следует приготовить взвеси вибрионов, содержащие в 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида $2 \times 10^9$, $1 \times 10^9$, $5 \times 10^8$, $2{,}5 \times 10^8$, $1{,}25 \times 10^8$ и $6{,}25 \times 10^7$ микробных клеток в 1 мл.

В опыт берут 4 белых или светло-серых кроликов массой 2,5—3,0 кг. За 24 ч до опыта удаляют шерсть с боковых поверхностей спины, используя депилаторий. После этого кожу тщательно промывают теплой водой и протирают полотенцем. Перед опытом поверхность кожи протирают стерильным ватным тампоном, смоченным спиртом и хорошо отжатым, а затем тампоном, смоченным стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида. Заражение животных проводят с соблюдением режима работы с возбудителем холеры. В депилированную поверхность кожи трех взрослых кроликов вводят внутрикожно по 0,1 мл культуры из каждого приготовленного разведения, начиная с меньшей дозы, по 2 ряда с каждой стороны на возможно отдаленном расстоянии. Четвертому кролику по 2 ряда с двух сторон вводят по 0,1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида (контроль). Результаты учитывают через 24 ч, измеряя линейкой и цир-

кулем размер образовавшейся папулы. За положительную реакцию принимают папулы размером 6 мм и более, папулы меньшего размера не учитывают.

Во время вскрытия у кроликов берут материал из органов и тканей для гистологического исследования.

Токсигенные штаммы вызывают кожную реакцию в дозах от $6{,}25 \times 10^7$ до $1{,}25 \times 10^8$ м. к. / мл.

Умеренно токсигенные штаммы вызывают кожную реакцию в дозе $2{,}5 \times 10^8$ м. к. / мл.

Слаботоксигенные штаммы вызывают кожную реакцию в дозах до $5 \times 10^8$ м. к. / мл.

Атоксигенные вызывают кожную реакцию лишь в дозах свыше $5 \times 10^8$ м. к. / мл.

Вакцинный штамм должен быть атоксигенным в опытах с кожной пробой.

Для выявления дерматонекротического фактора и токсических ферментных комплексов из суспензии микробных клеток, смытых с поверхности целлофана, готовят указанные выше разведения культуры. В депилированную поверхность кожи кролика вводят внутрикожно по 0,1 мл. Учет результатов проводят через 24 ч. Отмечают наличие некротических изменений в месте укола. Дерматонекротический фактор определяют по наличию зоны некроза не менее 2 мм.

Вакцинный штамм не должен вызывать некроза при внутрикожном введении.

**Приложение 5**
(обязательное)

## Определение безвредности и «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона при внутрикишечном введении кроликам-сосункам

Методика подготовки испытуемого штамма для данных испытаний аналогична описанной в прилож. 3.

Для изучения безвредности, «остаточной» токсигенности и возможного восстановления вирулентности испытуемого штамма производят десятикратные пассажи на кроликах-сосунках 10—12-дневного возраста массой 100—120 г, которым внутрикишечно вводят $10^7$ холерных вибрионов испытуемого штамма в 0,2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Для опытов берут по 2 кролика на пассаж. В качестве контроля при первом и десятом пассажах двум животным внутрикишечно вводят вместо микробов испытуемого штамма 0,2 мл физиологического раствора. Животных умерщвляют с помощью хлороформа через 48 ч после начала опыта. Всех крольчат вскрывают, регистрируют патологоанатомическую картину и производят высев содержимого толстого и тонкого кишечника, а у павших животных и мазков-отпечатков из внутренних органов – на питательные среды для идентификации холерных вибрионов. Для гистологического исследования от всех животных берут по 3—4 отрезка тонкого и толстого кишечника и кусочки из внутренних органов (печени, почек, надпочечников, селезенки, сердца, легких, мезентериальных лимфатических узлов). Дальнейшую гистологическую обработку морфологического материала ведут по общепринятой методике.

**Приложение 6**
(обязательное)

## Определение «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов

Методика подготовки испытуемого штамма для данных испытаний аналогична описанной в прилож. 3.

Для работы используют кроликов массой 2—2,5 кг, не получавших пищи в течение 24 ч. Под эфирным наркозом делают разрез по средней линии живота и извлекают петли тонкого кишечника. На 60 см проксимальнее аппендикса накладывают лигатуры, перевязывая четыре одинаковых участка кишечника длиной 12 см с промежутками между ними длиной 4—5 см. В 2 лигированные петли вводят 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, в оставшиеся две – по 1 мл исследуемой 3—4-часовой культуры испытуемого штамма, выращенной на щелочном агаре концентрацией $1 \times 10^7$ и $1 \times 10^9$ м. к./мл. Каждую дозу вводят кроликам. После этого брюшную стенку зашивают. Спустя 16—18 ч животных забивают воздушной эмболией и вскрывают. Обращают внимание на патологоанатомическую картину в перевязанных и нелигированных петлях тонкого кишечника. Для гистологического исследования вырезают кусочки из лигированных петель.

**Приложение 7**
(обязательное)

## Определение безвредности, «остаточной» токсигенности, реактогенности и приживаемости вакцинного штамма холерного вибриона при внутрижелудочном введении взрослым кроликам

В опыт берут 51 взрослого кролика массой 2—2,5 кг. За 24 ч до эксперимента животных лишают пищи.

Перед иммунизацией кроликам вводят внутривенно 50 мг циметидина на 1 кг массы животного. Через 15 мин, используя желудочный зонд, в полость желудка вливают 15 мл 5 %-го раствора соды (5 г гидрокарбоната натрия на 100 мл раствора). Еще через 15 мин через зонд повторно вливают 15 мл 5 %-го раствора соды и взвесь культуры холерных вибрионов в 1 мл питательного бульона или 1 %-й пептонной воды в дозах $5 \times 10^7$, $5 \times 10^9$ и $5 \times 10^{10}$ м. к. Каждую дозу вводят 16 животным. Контрольную группу из 3 кроликов обрабатывают аналогичным образом, за исключением того, что культуру холерного вибриона не вводят.

Животных до введения испытуемой культуры и ежедневно после ее введения взвешивают и термометрируют. Кроме этого, реактогенность и иммунологическую эффективность по титрам вибриоцидных и антитоксических антител определяют у кроликов, привитых аналогично для определения иммуногенности в острых опытах.

Умерщвляют опытных и контрольных кроликов через 1, 3, 7, 14, 28 и 35—40 сут. после введения испытуемого штамма – по 2 кролика на каждую дозу в каждый срок. Оставшихся кроликов (не умерщвленных в указанные выше сроки и погибших) исследуют в последний срок. Морфологическому исследованию подвергают животных, обработанных максимальной дозой ($5 \times 10^{10}$ м. к.) и контрольных. У животных наблюдают патоморфологическую картину в тонком и толстом кишечнике и других внутренних органах, кусочки из которых берут для гистологического исследования, забирают кровь – для определения титров вибриоцидных и антитоксических антител и для определения действия штамма на иммунную систему; производят

посевы кусочков органов (печень, селезенка, кровь, легкие, лимфатические узлы) и содержимого желудка, желчного пузыря, краниального и каудального отделов тонкого и толстого кишечника. Посевы производят на заранее проверенные по ростовым качествам щелочной агар и 1 %-ю пептонную воду. Посевы органов производят методом отпечатков, кровь – мазком-отпечатком отсеченной верхушки сердца. У животных, умерщвленных через 7 и 28 дней содержимое желудка, кишечника и желчного пузыря засевают во флаконы с 1 %-й пептонной водой для накопления холерных вибрионов и далее пересевают на пластинку щелочного агара и 1 %-ю пептонную воду (вторая среда накопления). Погибших животных исследуют так же, как и умерщвленных, обращая внимание на несвойственные для холеры изменения, связанные с возможным обострением скрытой инфекции.

После проведения посевов для гистологического исследования в каждом случае берут кусочки легких, сердца, печени, селезенки, почек с надпочечниками и несколько (3—4) отрезков толстого и тонкого кишечника. Перед взятием перевязывают отрезки кишечника длиной 3—4 см, в просвет вводят шприцем 10 %-й раствор формалина. После взятия материал помещают в 10 %-й раствор нейтрального формалина, затем обезвоживают, заливают в парафин, срезы окрашивают гематоксилином и эозином для обзорных исследований. В случае необходимости применяют специальные методы окраски препаратов.

**Приложение 8**
(обязательное)

## Определение влияния вакцинных штаммов холерного вибриона на иммунную систему взрослых кроликов

Методика подготовки испытуемого штамма для данных испытаний аналогична описанной в прилож. 3.

Влияние испытуемого штамма на иммунную систему определяют на кроликах породы «шиншила» массой 2—3 кг. Экспериментальных животных иммунизируют согласно прилож. 6 внутрижелудочно через зонд однократно дозами $5 \times 10^7$ м. к. и $5 \times 10^9$м. к. Иммунологические исследования проводят через 1, 3, 7, 14 и 28 сут. после введения испытуемого штамма. При обнаружении изменений в показателях необходимо срок наблюдения продлить до восстановления изучаемых показателей до исходного уровня и (или) уровня в контрольных группах.

Животных для данных опытов (по 5 кроликов массой 2,5—3 кг в группе) используют тех же, что и для определения безвредности, реактогенности и приживаемости штамма (прилож. 7) и при определении протективной активности при внутрижелудочном введении взрослым кроликам (прилож. 11). Проводят описанные ниже виды исследований в соответствии с РД 42-28-10—90 и «Медицинскими лабораторными технологиями» (Справочник, 2002).

### *8.1. Определение количества лейкоцитов в крови*

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

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

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

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

### *8.2. Определение лейкоцитарной формулы*

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

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

Мазки просматривают в световом микроскопе (иммерсионная система, объектив 90х, окуляр 7х или 10х). На каждом стекле суммарно просчитывают не менее 200 клеток, учитывая отдельные виды лейкоцитов. Исходя из полученных результатов, вычисляют процентное содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и других клеток белой крови. Чтобы определить содержание отдельных видов лейкоцитов в 1 мкл крови в абсолютных числах, необходимо сначала подсчитать общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови и, отбросив две последние цифры, умножить на процентное содержание отдельного вида. Например: количество лейкоцитов в 1 мкл крови равно 5 000, процент лимфоцитов равен 30. Следовательно, абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл крови будет составлять $50 \times 30 = 1500$.

### *8.3. Выделение лимфоцитов из крови кроликов*

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

### *8.4. Определение количества лимфоцитов во взвеси*

Из полученного 1 мл клеточной взвеси после ресуспендирования отбирают 0,02 мл и переносят в пробирку с 0,38 мл 3 %-го раствора уксусной кислоты, подсиненной раствором метиленового си-

него, затем перемешивают. Каплю содержимого пробирки помещают в счетную камеру Горяева. Клетки считают под микроскопом при малом увеличении (окуляр 10х, объектив 8х) в 100 больших квадратах и умножают полученное число на $5{,}0 \times 10^4$ (коэффициент пересчета количества клеток, подсчитанных в камере Горяева, в количество клеток, содержащихся в 1 мл взвеси). Необходимая для дальнейших исследований рабочая концентрация клеток должна составлять $2{,}0 \times 10^6$ клеток в 1 мл.

### *8.5. Определение жизнеспособности лимфоцитов*

К 0,1 мл взвеси лимфоцитов в рабочей концентрации добавляют 1 каплю 0,2 %-го раствора трипанового синего (или 0,1 мл 0,2 %-го эозина БА (индикатор, чда, по ТУ 6-09-260—70) в 0,9 % растворе натрия хлорида, pH 7,2). Суспензию оставляют на 30 с при температуре (20 ± 2) °С, а затем под микроскопом в камере Горяева учитывают результат. Живые лимфоциты остаются бесцветными, а погибшие клетки окрашиваются. При соблюдении правил выделения лимфоцитов живых клеток должно быть не менее 98 %.

### *8.6. Определение Т-лимфоцитов в крови кролика цитотоксическим тестом*

Цитотоксический тест используется для выявления антигенов клеточных мембран, специфичных для определенной субпопуляции клеток. Основной принцип метода заключается в том, что антитела, направленные против специфических лимфоцитарных антигенов, фиксируются на клетках, экспрессирующих эти антигены, и в присутствии комплемента нарушают целостность клеточной мембраны. Нарушение целостности мембраны лимфоцитов позволяет проникать внутрь клетки прибавленному к взвеси красителю (трипановый синий) и окрашивать их. Жизнеспособные клетки этим красителем не окрашиваются.

Поликлональную сыворотку против Т-лимфоцитов разводят средой 199 до рабочей концентрации, указанной на этикетке. В центрифужной пробирке или в лунке панели смешать 60 мкл сыворотки, 20 мкл исследуемой взвеси лимфоцитов (концентрация $2{,}0 \times 10^6$

кл/мл) и 20 мкл комплемента кролика в разведении 1 : 3. В контрольные пробирки или лунки вносят 20 мкл взвеси лимфоцитов (концентрация $2{,}0 \times 10^6$ кл/мл), 20 мкл взвеси комплемента и 60 мкл среды 199. Смеси перемешивают и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 2) °С в течение 25—30 мин. В каждую пробирку или лунку добавляют по 1 200 мкл 0,5 %-го раствора трипанового синего для приготовления указанного раствора 500 мг красителя растворяют в 100 мл горячего 80—90 °С 0,9 %-го раствора натрия хлорида; перемешивают 10 мин на магнитной мешалке и фильтруют через фильтровальную бумагу. Через 30—60 с взвесь из лунки помещают в счетную камеру Горяева. Определяют число погибших клеток, вычисляют их процент от общего количества клеток в опыте и контроле, подсчитывают цитотоксический индекс (ЦТИ) по формуле:

$$ЦТИ = 100 \times \frac{\%\ погибших\ клеток\ при\ опыте - \%\ погибших\ клеток\ в\ контроле}{100 - \%\ погибших\ клеток\ в\ контроле}$$

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

### *8.7. Определение В-лимфоцитов в крови кролика (одним из ниже приведенных методов)*

#### *8.7.1. Определение количества В-лимфоцитов цитотоксическим тестом*

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

#### *8.7.2. Определение количества В-лимфоцитов иммунофлюоресцентным методом*

Принцип метода основан на том, что В-лимфоциты несут поверхностные иммуноглобулины, которые выявляются в реакции им-

мунофлюоресценции с помощью антииммуноглобулиновых антител, меченных флюорохромом.

В пробирки, помещенные на ледяную баню, вносят 0,1—0,25 мл суспензии лимфоцитов ($2 \times 10^6$ лимф./мл) в растворе Хенкса с 1—2 %-м раствором бычьего сывороточного альбумина. Затем добавляют равный объем диагностических флуоресцирующих антивидовых, против иммуноглобулинов кролика, антител в рабочем разведении. Для приготовления раствора антител используют забуференный 0,9 %-й раствор натрия хлорида. Смесь инкубируют и помешивают в течение 30 мин при (4 ± 0,5) °С в присутствии 0,25 %-го раствора азида натрия, после чего суспензию клеток 3 раза отмывают, добавляя к осадку раствор Хенкса и центрифугируя (10 ± 1) мин при (450 ± 20) g. Последнее (третье) отмывание проводят охлажденным до 4 °С забуференным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, т. к. раствор Хенкса и среда 199 обладают оптической активностью и могут искажать результаты микроскопии. Осадок ресуспендируют в 0,05 мл забуференного 0,9 %-го раствора натрия хлорида и наносят на тщательно вымытое и обезжиренное предметное стекло (из нефлуоресцирующего стекла), с проведенными парафиновым стеклографом окружностями, ограничивающими исследуемый материал. Накрывают покровным стеклом, окантовывают вазелином и микроскопируют с помощью люминесцентного микроскопа, используя светофильтры, рекомендованные инструкцией для ФИТЦ, и масляную иммерсионную систему. При микроскопии учитывают клетки, имеющие кольцевое или точечное (гранулярное) свечение. Диффузно окрашенные клетки не учитываются. Параллельно с помощью фазово-контрастного устройства проводят подсчет количества клеток в каждом поле зрения. Относительное процентное содержание В-лимфоцитов определяют после подсчета 200—300 клеток в препарате по формуле:

$$X = \frac{B \times 100}{A}, \text{ где}$$

А – общее количество клеток;

В – количество клеток со специфическим свечением.

Для подсчета абсолютного содержания В-лимфоцитов используют следующую формулу:

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

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

Результаты исследований отражают в таблице:

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

**Примечание:** р – уровень достоверности различий ($р < 0,05$)

### *8.8. Определение фагоцитарной активности макрофагов*

Фагоцитарная активность (ФА) макрофагов оценивается по следующим показателям: процент фагоцитирующих клеток (ПФ) и фагоцитарное число (ФЧ) – количество микробных клеток на один фагоцит.

Клетки перитонеального экссудата (КПЭ) выделяют асептически от кроликов опытной и контрольной групп. Делают разрез по срединной линии передней брюшной стенки и осторожно отсепаровывают кожный лоскут, не нарушая целостности брюшины. Через прокол иглой, соединенной со шприцем, в брюшную полость вводят 20 мл среды 199, содержащей 5 МЕ гепарина в 1 мл. Осторожно массируют переднюю брюшную стенку. Через 3—5 мин через над-

рез в брюшине пастеровской пипеткой, соединенной с резиновой грушей, собирают содержимое и сливают через нейлоновый фильтр в пробирки, стоящие на льду. Не используют экссудаты, содержащие примесь эритроцитов. Затем клетки осаждают центрифугированием (280 ± 20) g при температуре (4 ± 0,5) °С в течение (10 ± 1) мин, ресуспендируют в среде 199 с 10 % сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиками (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) до конечной концентрации $2 \times 10^6$ кл/мл. Полученную суспензию клеток разливают по 2 мл в чашки Петри диаметром 40 мм, которые инкубируют при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере с 5 % $CO_2$. Через 60 мин смывают неприкрепившиеся к пластику клетки раствором Хенкса, добавляют 2 мл свежей среды 199 и инкубируют в течение следующих 18 ч при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере с 5 % $CO_2$.

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

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

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

В чашки Петри, содержащие КПЭ, вносят по 1 мл свежей среды 199 и по 1 мл 0,5 % взвеси ЭБ или соответствующих микроорганизмов (концентрация $1—2 \times 10^9$ м. к./мл) и инкубируют при температуре (37 ± 0,5) °С в атмосфере 5 % $CO_2$. Через 30—60 мин чашки промывают холодным раствором Хенкса, высушивают при комнатной температуре, фиксируют в метаноле (или в смеси Никифорова) или парами 10 %-го раствора формалина (5—10 мин), окрашивают по Романовскому-Гимзе.

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

Результаты оценивают по следующим показателям: процент фагоцитирующих клеток (ФА) и фагоцитарное число (ФЧ), которое определяется средним числом поглощенных ЭБ или микроорганизмов на один фагоцит.

Процент фагоцитирующих клеток (ФА) рассчитывается по формуле:

$$ФА = \frac{B \times 100}{A}, \text{ где}$$

A – общее количество клеток;

B – количество фагоцитирующих клеток (фагоциты с поглощенными ЭБ или микробными клетками).

Результаты исследований представляют для каждой дозы в таблице :

| Сутки исследования | ФА | р с контролем | ФЧ | р с контролем |
|---|---|---|---|---|
| Контроль | | | | |
| 1 | | | | |
| 3 | | | | |
| 7 | | | | |
| 14 | | | | |
| 28 | | | | |

**Примечание:** р – уровень достоверности различий ($p < 0,05$)

### *8.9. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) спонтанная и митогениндуцированная Т- и В- митогенами*

Реакция бласттрансформации лимфоцитов под влиянием Т- и В-клеточных митогенов служит для оценки функциональной активности лимфоцитов. Специфическое распознавание митогена индуцирует в клетках процесс пролиферации, т. е. деление клеток. Митогены селективно стимулируют пролиферацию различных субпопуляций лимфоцитов. КонА стимулирует тимоциты, зрелые и незрелые Т-клетки, ФГА стимулирует пролиферацию только зрелых Т-клеток.

Такие митогены, как липополисахарид и бактериальный липопротеин стимулируют пролиферацию В-клеток. Благодаря этой селективности, митогены могут использоваться для характеристики функционального состояния различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

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

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

*Учет результатов*

Результаты представляют в виде индексов стимуляции клеток (ИС), которые подсчитывают по формуле:

$$ИС = \frac{\textit{количество имп / мин в культуре с митогеном (опыт)}}{\textit{количество имп / мин в культуре без митогена (контроль)}}$$

Результаты исследований отражают в таблице.

| Сутки | № кролика | ИС Т-клеток | | | | ИС В-клеток | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ФГА | р с К | Con A | р с К | ЛПС | р с К |
| 7 | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | |
| Контроль (К) | | | | | | | |

**Примечание:** р – уровень достоверности различий ($p < 0,05$)

### *8.10. Определение поликлональной активности В-лимфоцитов*

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

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

Эритроциты барана (ЭБ) трижды отмывают 0,9 %-м раствором натрия хлорида pH 7,2, осаждая центрифугированием при (400 ± 20) g в течение 7 мин, добавляют к 0,9 %-му раствору агарозы из расчета $2—3 \times 10^7$ эритроцитов в 1 мл. Полученную рабочую смесь разливают по 2,5 мл в пробирки, помещенные в водяную баню при температуре 43—44 °С. В каждую пробирку добавляют по 0,2 мл взвеси исследуемых клеток селезенки кроликов (концентрация $10^7$ кл/мл), перемешивают и выливают в чашку Петри диаметром 90 мм, равномерно распределяя по дну. Через 5 мин чашки помещают в термостат при температуре (37 ± 0,5) °С на 1 ч. Затем в каждую чашку вносят путем наслаивания по 2,5 мл комплемента морской свинки (сухого), разведенного в 5 раз средой 199 или разведенного в 10 раз свежезамороженного комплемента. После 30 мин инкубации при температуре (37 ± 0,5) °С, подсчитывают число зон

гемолиза на каждой чашке. Рассчитывают число АОК на $1 \times 10^6$ ядросодержащих клеток селезенки. Рассчитывают индекс поликлональной стимуляции (ИПС) по формуле:

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

Результаты исследований для кроликов, иммунизированных дозами ($5 \times 10^7$ и $5 \times 10^9$ вибрионов) отражают в таблице.

| Сутки | Число АОК на $10^6$ | p с К | Индекс поликлональной стимуляции |
|---|---|---|---|
| Контроль (К) | | | |
| 3 | | | |
| 7 | | | |
| 14 | | | |
| 28 | | | |

**Примечание:** p – уровень достоверности различий ($p < 0,05$)

*Приготовление 0,9 %-ного раствора агарозы.* Навеску сухой агарозы (см. табл.) смешивают с дистиллированной водой, смесь кипятят на водяной бане до полного растворения агарозы; емкость с раствором переносят в водяную баню с температурой 43—44 °С, добавляют 10-кратный раствор Хенкса, pH раствора до 7,2—7,4 доводят 1 %-м раствором $KH_2PO_4$ или 7,5 %-м раствором натрия бикарбоната (по цвету индикатора, присутствующего в растворе Хенкса и имеющего при значениях pH 6,8—7,0 желтовато-оранжевый цвет, 7,2—7,4 розовато красный цвет, при значениях pH выше 7,4 – малиновый цвет).

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

### *8.11. Исследование иммунореактивности на гетерологичный антиген*

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

Для проведения этих экспериментов кроликов разделяют на 2 группы по 5 штук в каждой. Кроликов первой группы иммунизируют изучаемым штаммом внутрижелудочно через зонд однократно дозой $5 \times 10^9$м.к. (см. прилож. 6), кролики второй группы – контрольные (интактные). Кроликам обеих групп вводят внутривенно по 1 мл 50 %-й взвеси отмытых эритроцитов барана. Иммунный ответ на гетерологичный антиген оценивают по количеству АОК (методика определения АОК см. п. 8.10) через 4 сут. после введения эритроцитов. Рассчитывают индекс поликлональной стимуляции (ИПС) по формуле:

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

Результаты исследований отражают в таблице:

| Группа кроликов | АОК к ЭБ | Индекс стимуляции | p с контрольными животными |
|---|---|---|---|
| Иммунизированные | | | |
| Контрольные | | | |

**Примечание:** p – уровень достоверности различий ($p < 0,05$)

**Приложение 9**
(обязательное)

## Определение стабильности биологических свойств вакцинного штамма холерного вибриона

Методика подготовки испытуемого штамма для данных испытаний аналогична описанной в прилож. 3.

### *9.1. Определение стабильности штамма холерного вибриона на кроликах-сосунках*

Для определения стабильности свойств вакцинного штамма проводят серию из 10 последовательных пассажей на жидких и плотных питательных средах и 10 последовательных пассажей через организм крольчат-сосунков. Крольчатам первого пассажа вводят внутрикишечно три дозы ($10^3$, $10^5$ и $10^7$ вибрионов). Каждую дозу вводят 3 крольчатам. Методика пассирования приведена в прилож. 4. Далее пассажи ведут двумя методами: заражают крольчонка содержимым кишечника предыдущего животного или вводят культуру, выделенную на питательных средах от животного предыдущего пассажа. Культуры, выделенные от животного последнего пассажа, изучают по всем культурально-морфологическим, биохимическим свойствам, безвредности и атоксигенности для кроликов, генетической стабильности (на соответствие с паспортными данными) по схеме, изложенной в прилож. 1—6.

### *9.2. Изучение стабильности свойств вакцинного штамма методом популяционного анализа*

На пластинки питательного агара (по МУК 4.1/4.2.588—96) отсевают 3 линии культуры: после 10 пассажей на крольчатах-сосунках, после 10 пересевов на питательных средах и исходную лиофильно-высушенную из ампул. По 100 изолированных колоний каждой линии снимают и суспендируют каждую в своей лунке репликатора, после чего пересевают методом отпечатков сначала на пластинку с питательным агаром, затем на пластинку с агаром, содержащим антибиотики-маркеры изучаемых свойств (например, канамицин 50 мкг/мл и триметоприм 100 мкг/мл). Генетическую стабильность испытуемых субкультур оценивают по количеству клеток, сохранивших генетические маркеры. Разброс в количестве выросших колоний всех трех линий не должен превышать 10 %. Наличие в популяции 90 % клеток, сохранивших генетические маркеры, свидетельствуют о стабильности генома испытуемого штамма.

**Приложение 10**
(обязательное)

## Определение иммуногенности вакцинного штамма холерного вибриона

Для определения иммуногенности испытуемого вакцинного штамма холерного вибриона используют взрослых кроликов массой 2—3 кг. Животных делят на три группы по 16 особей в каждой. Первую группу животных иммунизируют внутрижелудочным введением $5 \times 10^7$ м.к., вторую – $5 \times 10^9$м. к. и третью – $5 \times 10^{10}$ м .к. / мл. Исследование проводят до иммунизации, через 3, 7, 14 и 28 сут. после иммунизации. Для этого умерщвляют по 4 кролика из каждой группы. Перед умерщвлением у животных производят забор крови для определения агглютинирующих, вибриоцидных и антитоксических антител. От умерщвленных животных берут содержимое кишечника для определения копроантител.

Вакцинный штамм должен вызывать накопление в сыворотке крови агглютинирующих, вибриоцидных и антитоксических антилел, в кишечнике – копроантител в статистически значимых количествах.

### *10.1. Определение агглютинирующих антител в сыворотке крови кроликов*

Агглютинирующие антитела определяют в пробирочной реакции агглютинации. Для этого испытуемую сыворотку разводят 0,9 %-м раствором натрия хлорида до 1 : 10 и далее последовательно двукратно до разведения 1 : 320. Титры агглютинирующих антител определяют со штаммами *V. cholerae* М-800 биовара эльтор серовара Огава, *V. cholerae* М-879 биовара эльтор серовара Инаба, *V. cholerae* 569-В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава. Для этого в 4 ряда пробирок вносят по 0,5 испытуемой сыворотки каждого разведения и добавляют в каждый ряд по 0,5 мл взвеси вышеуказанных штаммов холерных вибрионов. Каждая взвесь должна содержать $1 \times 10^9$ вибрионов в 1 мл (5 единиц по стандартному образцу мутности ОСО 42-28—86 П), выращенных при температуре 37 °С в течение 18—20 ч

на пластинках щелочного агара для культивирования холерных вибрионов. Для контроля используют пробирки с 0,5 мл сыворотки и 0,5 мл взвеси холерных вибрионов, разведенных 0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Затем пробирки тщательно перемешивают путем осторожного встряхивания и помещают в термостат при температуре 37 °С на 2 ч и далее на 18—20 ч при температуре 18—22 °С. Реакцию учитывают как положительную при ясно видимых хлопьях агглютината (+++), при отсутствии таковых в контрольных пробирках. За титр сыворотки принимают ее наибольшее разведение, в котором отмечалась положительная реакция агглютинации.

### *10.2. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови кроликов*

Титры вибриоцидных антител определяют со штаммами *V. cholerae* биовара эльтор М-800 серовара Огава и М-879 серовара Инаба.

Исследуемые сыворотки крови кроликов разводят 1 : 10 0,9 %-м раствором натрия хлорида, инактивируют в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин для разрушения комплемента. В качестве положительного контроля используют сыворотку диагностическую холерную О1 (ОСО 42-28-26—84П). Микротитровальные пластины помещают в кювету. Начиная со второй лунки микропланшета микродозатором вносят во все лунки по 1 капле (0,05 мл) 0,9 %-го раствора натрия хлорида, затем в первые и вторые лунки каждого ряда – по 1 капле испытуемых сывороток в разведении 1 : 10. Сыворотки титруют со второй лунки до седьмой, перенося по одной капле, после перемешивания из последней лунки одну каплю удаляют. Получают разведения сывороток от 1 : 10 до 1 : 640 (7 лунка). В 8 лунке контроль – 1 капля 0,9 %-го раствора натрия хлорида и 1 капля взвеси вибрионов с концентрацией $1 \times 10^8$ м. к. / мл.

Штаммы холерных вибрионов выращивают в течение 3 ч на свежеприготовленных пластинах щелочного агара (ФСП 42-0010-2989—02 или ФСП 42-0026-2132—01) при температуре (37 ± 1) °С. Культуры смывают охлажденным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, готовят взвеси концентрацией $2 \times 10^9$ вибрионов/мл, эквивалентные ОСО 42-28—85П 10 единиц, затем разводят до концентрации

$1 \times 10^8$ м. к. / мл. Пробирки с микробными взвесями каждого штамма помещают в ванночку со льдом. Затем к 5 мл взвеси каждой культуры добавляют 5 мл комплемента и тщательно перемешивают. Для этого используют стандартный комплемент сухой, разведённый до рабочего титра, или свежеприготовленную сыворотку крови морской свинки в разведении 1 : 20.

Для проверки правильности приготовления концентрации вибрионов каждую культуру холерных вибрионов *V. cholerae* биовара эльтор М-800 серовара Огава и М-879 серовара Инаба разводят отдельной стерильной пипеткой последовательно десятикратно до концентрации $1 \times 10^3$ м. к./мл. Затем из каждой взвеси вибрионов с концентрацией $1 \times 10^3$ м. к. отдельными пипетками высевают по 0,1 мл на пластинки с питательным агаром в чашки Петри и равномерно распределяют по поверхности агара покачиванием. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 18—24 ч, после чего подсчитывают количество выросших колоний. Высев на чашку с агаром делают дважды: до и после часовой инкубации культур при температуре 37 °С. В первом случае высев делают для уточнения количества живых вибрионов во взвеси, во втором – количества подросших вибрионов.

Охлажденную смесь культуры и комплемента вносят микродозатором по одной капле во все лунки микротитровальной пластины с исследуемыми образцами сыворотки. Микропланшеты плотно закрывают крышками и помещают во влажную камеру (плотно закрытая кювета с чашкой Петри, в которую помещена вата, смоченная 0,9 %-м раствором натрия хлорида) на 1 ч при температуре 37 °С. Затем во все лунки микропланшета пипеткой объемом 5 мл закапывают по 2 капли бульона сердечной мышцы pH 7,6. Микропланшеты закрывают крышками, кювету помещают в термостат при температуре 37 °С на 3 ч, после чего микропланшеты просматривают в проходящем свете на темном фоне. Отмечают лунки, где бульон стал прозрачным (имеются вибриоцидные антитела) и где есть рост вибрионов (вибриоцидные антитела отсутствуют). Окончательный учет результатов проводят через 16—20 ч дополнительной инкубации пластин при температуре 4 °С.

За титр вибриоцидных антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором отмечалось вибриоцидное действие (лизис культуры). В посевах контрольных взвесей без дополнительной инкубации должно вырасти не менее 30 колоний, после дополнительной инкубации это количество должно увеличиться не менее чем на 30 %.

Результаты исследований отражают в таблице.

| Дозы для иммунизации (м.к./мл) | Сроки после введения (дни) | Титры вибриоцидных антител (обратные значения средних геометрических титров и количество позитивных сывороток) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *V. cholerae* М-800 | | *V. cholerae* М-879 | |
| | | Количество серопозитивных сывороток X±m | Количество серонегативных сывороток X±m | Количество серопозитивных сывороток X±m | Количество серонегативных сывороток X±m |
| До иммунизации | | | | | |
| $5 \times 10^7$ | 3 | | | | |
| | 7 | | | | |
| | 14 | | | | |
| | 28 | | | | |
| $5 \times 10^9$ | 3 | | | | |
| | 7 | | | | |
| | 14 | | | | |
| | 28 | | | | |
| $5 \times 10^{10}$ | 3 | | | | |
| | 7 | | | | |
| | 14 | | | | |
| | 28 | | | | |
| Контроль с сывороткой холерной О1 | | | | | |

### *10.3. Определение титров антитоксических антител в сыворотке крови кроликов*

Титры антитоксических антител определяют по их нейтрализующей активности в отношении холерного энтеротоксина (ОСО 42-28-75—83П токсина холерного жидкого).

Предварительно токсин холерный жидкий титруют на взрослых кроликах по Крейгу с целью определения минимальной дозы, вызывающей образование папулы диаметром 10 мм и толщиной складки при измерении штангенциркулем 7—8 мм.

Исследуемые сыворотки иммунизированных кроликов разводят сначала в 2 раза, затем последовательно двукратно, получая разведения от 1 : 4 до 1 : 128 в объеме 0,2 мл. В каждое разведение сыворотки вносят по 0,2 мл раствора, содержащего по 2 кожные дозы токсина холерного. Для контроля используют: смесь 0,2 мл нормальной кроличьей сыворотки и 0,2 мл указанного выше раствора токсина холерного (2 кожные дозы) и смесь 0,2 мл ОСО-42-28—83П сыворотки антихолерогенной, содержащей 2 антитоксические единицы, с 0,2 мл раствора токсина холерного, содержащего 2 кожные дозы. Пробирки встряхивают, выдерживают 1 ч при температуре 37 °С и затем вводят по 0,1 мл в депиллированную кожу кролика. Учет результатов проводят через 24 ч после внутрикожного введения. За положительную реакцию принимают отсутствие зоны отека или наличие ее размером менее 5 мм. В контроле зона отека должна быть размером 5—10 мм.

За титр испытуемой сыворотки принимают ее наибольшее разведение, при котором наблюдается нейтрализация действия токсина (зона отека отсутствует или меньше 5 мм).

Результаты исследования отражают в таблице.

| Иммунинизирующие дозы (в м. к. / мл) | Общее число проб | Из них проб с титрами антитоксических антител | | | | | | Титры антитоксических антител (X±m) (обратные значения средних геометрических титров) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | |
| До иммунизации | | | | | | | | |
| $5 \times 10^7$ | | | | | | | | |
| $5 \times 10^9$ | | | | | | | | |
| $5 \times 10^{10}$ | | | | | | | | |
| Контроль токсина | | | | | | | | |
| Контроль токсин +ОСО антихолерогенной сыворотки | | | | | | | | |

### *10.4. Определение копроантител*

Для определения копроантител (кишечных) используют метод иммунофлуоресценции. Из взвесей трех штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба, *V. cholerae* М-3122 биовара эльтор серовара Огава и М-879 биовара эльтор серовара Инаба с концентрацией $1 \times 10^9$ м. к./мл готовят мазки на предметных стеклах, сушат их, фиксируют 96° спиртом в течение 20 мин. Содержимое кишечника или соскоб со слизистой оболочки тонкого кишечника разводят 1 : 5 0,9 %-м раствором натрия хлорида, центрифугируют для удаления механических частиц и титруют с шагом 2 до разведения 1 : 256. По 1 капле каждого разведения наносят на предметное стекло с мазками штаммов холерных вибрионов и выдерживают 20 мин во влажной камере. Затем препарат осторожно промывают 3 раза забуференным 0,9 %-м раствором натрия хлорида и дистиллированной водой, высушивают и наносят иммуноглобулины, специфичные к глобулинам кролика, меченные FITC или флуоресцеином. Предметное стекло с мазками помещают

во влажную камеру на 20 мин. После окрашивания мазки промывают, как указано выше, высушивают и просматривают с помощью люминесцентного микроскопа. При наличии копроантител холерные вибрионы в мазке приобретают ярко-зеленое свечение.

Результаты исследований отражают в таблице.

| Иммунизирующие дозы (в м. к./мл) | Штаммы | Общее число проб | Из них проб с титрами копроантител | | | | | Титры копроантител (X±m) (обратные значения средних геометрических титров) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | < 1 : 8 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | |
| До иммунизации | | | | | | | | |
| $5 \times 10^7$ | 569В | | | | | | | |
| | Р-3122 | | | | | | | |
| | М-879 | | | | | | | |
| $5 \times 10^9$ | 569В | | | | | | | |
| | Р-3122 | | | | | | | |
| | М-879 | | | | | | | |
| $5 \times 10^{10}$ | 569В | | | | | | | |
| | Р-3122 | | | | | | | |
| | М-879 | | | | | | | |

За титр копроантител принимают наибольшее разведение исследуемой пробы, при котором наблюдалось ярко-зеленое свечение холерных вибрионов.

**Приложение 11**
(обязательное)

## Определение протективной активности вакцинного штамма холерного вибриона

### *11.1. Определение протективных свойств на взрослых кроликах при их внутрижелудочной иммунизации через зонд и последующем заражении с помощью RITARD – техники (RITARD-модель)*

Протективные свойства вакцинного штамма определяются на взрослых кроликах с помощью RITARD (removable intestinal tie-adult rabbit diarrhoea) – техники (RITARD-модель), основанной на внутрикишечном заражении вирулентными штаммами *V. cholerae* взрослых кроликов с предварительным наложением особой скользящей временной лигатуры на подвздошную кишку в области мезоаппендикса на срок, необходимый для адгезии и ранней колонизации тонкого кишечника холерными вибрионами, и последующего мониторинга инфекционного процесса.

Для определения протективных свойств вакцинного штамма холерного вибриона взрослых кроликов массой (2,5 ± 0,3) кг разделяют на 2 группы: одна интактная, другая – через 14 дней после иммунизации внутрижелудочно через зонд оптимально иммуногенной дозой вакцинного штамма ($5 \times 10^9$ вибрионов). Методика иммунизации приведена в прилож. 7.

Для заражения иммунизированных кроликов используют вирулентный штамм *V. cholerae* O1 Огава или O139 серогруппы из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Кроликов обеих групп заражают с помощью RITARD-техники (RITARD-модель) вирулентной культурой *V. cholerae* в дозах $10^6$, $10^8$, $10^{10}$, $10^{12}$ микробных клеток по 4—5 кроликов на каждую заражающую дозу. За сутки до заражения животных лишают корма без ограничения употребления воды.

*11.1.1. Подготовка штаммов V. cholerae к использованию в RITARD-модели*

Штамм, предназначенный для заражения животного, бактериологической петлей № 2 засевают в пробирку с 4—5 мл 1 %-й пептонной воды или бульона Мартена (7,6—7,8, выращивают при (37 ± 0,5) °С в течение 6 ч, после чего производят высев на чашки со щелочным агаром pH 8,0. После инкубации при температуре (37 ± 0,5) °С (16 ± 0,5) ч отбирают S-формы колоний и готовят взвесь в 0,9 %-м растворе натрия хлорида pH 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-86П 5 единиц, эквивалентному $1,1 \times 10^9$ вибрионов. Необходимо заранее рассчитать начало подготовки культуры по времени, чтобы она была готова к моменту проведения оперативного вмешательства.

Животных заражают в дозах $10^6$, $10^8$, $10^{10}$, $10^{12}$ м. к. в объеме 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида pH 7,2. Контроль правильности приготовления заражающих доз проводят посредством высевов 100 м. к. из разведения $10^{-6}$ ($10^3$ м. к. в 1 мл) на три чашки качественного щелочного агара с последующим визуальным подсчетом типичных по культурально-морфологическим признакам колоний *V. cholerae*.

*11.1.2. Подготовка и стерилизация хирургического инструментария, шовного и перевязочного материалов*

Перед операцией инструменты и иглы кипятят в 1 %-м содовом растворе в течение 15 мин. Скальпели кипятят отдельно в 2—3 %-м растворе соды. Укладывают их на сетку стерилизатора, покрытую одним слоем марли. Учет времени стерилизации ведут с момента явного кипения.

Шелковые нити перед стерилизацией моют в горячей воде с мылом 2 мин, затем прополаскивают, высушивают и наматывают рыхло, не более 4—6 рядов, на стеклянные катушки, предметные стекла или стеклянные палочки. Стерилизацию проводят путем погружения в 70 ° спирт на 48 ч. Синтетические нити, намотанные на стеклянные палочки, стерилизуют кипячением в воде в течение 20 мин.

Для хирургической работы готовят ватные шарики, ватно-марлевые шарики, марлевые тампоны, салфетки, палочки с ватой. Салфетки для покрытия операционного поля размером (20 × 30) см с

вертикальным разрезом по центру длиной 10 см изготавливают из льняной ткани. Ватный валик для прикрытия шва, накладываемого на операционную рану, изготавливают из негигроскопичной ваты, растягивая равномерно до длины 12—15 см и диаметра 3 см. Перевязочный материал стерилизуют в автоклаве.

*11.1.3. Технология RITARD-модели*

Из марлевых жгутов, предварительно смоченных 3 %-м раствором хлорамина и туго отжатых, делают фиксирующие петли, которые прочно закрепляют на конечностях кролика над суставами во избежание соскальзывания. Затем животное привязывают к станку для фиксации за конечности брюшком кверху. Станок устанавливают в металлический поддон, куда с боков выкладывают смоченные 3 %-м раствором хлорамина большие ватные тампоны (на случай излития содержимого брюшной полости во время операции после введения культуры холерного вибриона).

На месте разреза по средней линии от нижнего края грудины до нижней части брюшка (11—12 см) шерсть выстригают тупоконечными изогнутыми ножницами и затем удаляют тампоном, смоченным в воде. Место разреза обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным 70 ° спиртом, двукратно смазывают кожу 5 %-м спиртовым раствором йода.

Животным вводят 1,0—1,5 мл миорелаксанта для ветеринарного применения – рометар 2 % (ROMETAR, СПОФА, Прага). Оперативное вмешательство проводят под местной анестезией или общим (эфирным) наркозом.

Перед разрезом точно намечают ориентиры, определяющие его правильность, отступая на 2 см от нижнего края грудины до нижней части брюшка по средней линии (11—12 см).

После выполнения разреза накладывают стерильную полотняную салфетку (20 × 30) см, предварительно продольно разрезанную по центру и точно такого же размера салфетку из полиэтилена, также разрезанную по центру. Полиэтиленовые салфетки перед операцией замачивают в 70 ° спирте и ex tempore просушивают во время подготовки животного. Обе салфетки необходимо закрепить к краям разреза четырьмя стерильными хирургическими зажимами.

При помощи двух анатомических пинцетов осторожно извлекают петли кишечника и размещают их на поверхности полиэтиленовой салфетки, периодически смачивая стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида, подогретым до температуры 37 °С.

Накладывают постоянную лигатуру на слепую кишку как можно ближе к илеоцекальному соединению. Место наложения выбирают, идя от аппендикса в сторону илеоцекального соединения, избегая попадания кровеносного сосуда в перевязь. Концы лигатуры коротко обрезают. Далее накладывают на подвздошную кишку в области мезоаппендикса «скользящую петлю». Лигатура не должна пересекать ни одного из сосудов. Концы лигатуры должны быть достаточно длинными для того, чтобы можно было их вывести на поверхность и при перистальтике кишечника они не ушли бы вовнутрь брюшной полости. После наложения обеих лигатур петли кишечника орошают теплым 0,9 %-м раствором натрия хлорида (не выше температуры 37 °С).

Затем в передний отдел тощей кишки вводят приготовленные разведения культуры ($10^6$, $10^8$, $10^{10}$, $10^{12}$ м. к. в объеме 1 мл) вирулентного штамма холерного вибриона. Далее с помощью анатомических пинцетов кишечник погружают в брюшную полость, не допуская перекручивания петель. Концы лигатуры укладывают на покрытый салфеткой край операционной раны, не допуская их натягивания. Накладывают швы на брюшину и кожу (лучше раздельно). При завязывании швов пропускают оба конца лигатуры между любыми двумя близлежащими швами.

Необходимо наложить поверх шва стерильный валик из негигроскопичной ваты с целью предохранения от загрязнения после помещения животного в металлический садок и и закрепить его концом наружных лигатур. Через 2 ч с момента введения культуры холерного вибриона временную лигатуру (скользящая петля), наложенную на подвздошную кишку, снимают.

Перед снятием лигатуры необходимо убедиться в том, что животное находится в спокойном и обездвиженном состоянии под действием наркоза. При появлении первых признаков слабой двигательной активности следует использовать дополнительное внутримышечное введение миорелаксаната (рометара) в дозе 0,5—0,7 мл. Дальнейшие действия производят при успокоении животного.

С помощью пинцетов оператор высвобождает концы лигатуры из-под валика, закрывающего шов. Осторожно потягивая за длинный конец, следует регулировать развязывание узла внутри брюшной полости, проявляющееся в свободном прохождении нити. Недопустимо приложение даже малейших усилий. Обычно лигатура развязывается свободно. При затруднении производят слабые качающие движения. После окончательного высвобождения длинного конца следует остановить вытягивание нити из брюшной полости и обрезать под небольшим натяжением короткий конец, чтобы при втягивании в брюшную полость не попадал находящийся на поверхности кожи и подвергающийся контаминации участок. Если лигатура не развязывается, следует распустить 1—2 шва в асептических условиях, разрезать лигатуру и заново наложить швы. При возникновении реакции животного на прикосновение инструментов, для повторного наложения швов следует произвести дополнительное местное обезболивание 2 %-м раствором лидокаина гидрохлорида.

После снятия лигатуры животное необходимо осторожно вернуть на прежнее место. С целью наблюдения за характером выделений прооперированного животного в качестве подстилочного материала используют лист плотной белой бумаги (в соответствии с размерами металлического садка), подлежащий ежедневной замене. В садок устанавливают миски с водой и кормом (из рациона исключается свекла).

Наблюдение за животными осуществляют в течение 5 сут. в интервалы 16—18, 20—30, 40—42, 44—54, 64—66, 68—78, 88—90, 92—102, 112—120 ч, отмечая признаки экспериментальной холеры: наличие диареи (характер, цвет и обильность выделяемых испражнений на подстилочном материале, присутствие жидких каловых масс на задних лапках и в области анального отверстия, брюшка или грудной части туловища), малая подвижность, взъерошенность шерсти. По своему характеру испражнения могут быть водянистыми; слизистыми, жидкими, бесцветными, белесоватого или калового (желтого, желто-зеленого, бурого) цвета; жидкими кашицеобразными с примесью слизи. Испражнения здорового кролика имеют форму плотных «орешков» бурого или коричневого цвета.

Мониторинг длительности выделения холерных вибрионов инфицированными кроликами осуществляется путем ежедневного за-

бора ректального материала с последующим посевом на щелочной агар и 1 %-ю пептонную воду pH 8,0. Выросшие колонии идентифицируют по комплексу признаков в соответствии с МУ 4.2.1097—02 «Лабораторная диагностика холеры». Регистрируют сроки гибели животных. Отдельные животные могут погибнуть в ранние сроки после заражения без визуальных проявлений диареи, описанных выше. На вскрытии у них при осмотре, как правило, регистрируется наличие жидкого содержимого в кишечнике.

Выжившими считают кроликов, оставшихся живыми через 120 ч (5 сут.) наблюдения. По истечении этого срока их забивают и вскрывают. Всех погибших животных, а также всех выживших и умерщвленных через 5 сут. после заражения, подвергают бактериологическому исследованию. Проводят посев содержимого тонкого и толстого кишечника, слизистой тонкого и толстого кишечника на щелочной агар и 1 %-ю пептонную воду pH 8,0. Выросшие колонии идентифицируют по комплексу признаков в соответствии с МУ 4.2.1097—02 «Лабораторная диагностика холеры».

Погибшими от холеры считают животных с проявлениями диареи и с положительными результатами бактериологического исследования на холеру.

Дозу вирулентного штамма холерного вибриона ($LD_{50}$), вызвавшую гибель 50 % кроликов в группе зараженных иммунных и зараженных интактных животных вычисляют по методу, изложенному в монографии И. П. Ашмарина и В. В. Воробьева (1962). Рассчитывают индекс иммунитета (ИИ) – отношение величины $LD_{50}$ заражающего штамма для иммунных животных к величине $LD_{50}$ этого же штамма для контрольных животных. Чем выше индекс иммунитета, тем иммуногеннее испытуемый штамм.

При правильном выполнении технологии метода RITARD кролики без какого-либо антигенного или лекарственного воздействия, которым вместо культуры холерных вибрионов внутрикишечно введен 0,9 %-й раствор хлорида натрия, имеют продолжительность жизни свыше 120 ч (5 сут.). Признаки диареи у них отсутствуют.

### *11.2. Оценка иммуногенности штамма по снижению количества вирулентных вибрионов, прикрепившихся к кишечному эпителию иммунных кроликов*

Трех кроликов массой 2,5—3 кг иммунизируют дозой $5 \times 10^9$ вибрионов испытуемого штамма внутрижелудочно через зонд (см. п. 11.1). Через 14 сут. после иммунизации у них определяют иммуногенность по снижению количества прикрепившихся к кишечному эпителию вибрионов.

Для определения адгезии холерных вибрионов в лигированную петлю (длиной 10 см) тонкой кишки 3-х иммунизированных 3-х интактных взрослых кроликов вводят по 2 мл взвеси вирулентного штамма холерного вибриона концентрацией $10^6$ клеток/мл. Через 4 ч кроликов умерщвляют. Лигированную петлю каждого кролика извлекают и помещают в кювету. В петлю вводят 10 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида и промывают поочередно, поднимая за лигатуры концы петли. Затем содержимое петли переносят в пробирку. Петлю кишки помещают в гомогенизатор с 30 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. После гомогенизации полученный гомогенат переносят в стерильную колбочку. Из смыва и гомогената высевают по 0,1 мл из каждого на 10 чашек со щелочным агаром. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18 ч. Подсчитывают количество выросших колоний холерных вибрионов. По числу выросших колоний рассчитывают количество вибрионов во всем объеме смыва и во всем объеме гомогената промытой петли тонкой кишки. Затем по этим величинам определяют процент адгезировавшихся холерных вибрионов от общего количества вибрионов, обнаруженных в лигированной петле (в смыве + в гомогенате). Например, на 10 чашках из смыва (посеян 1 мл) выросло 108 колоний холерных вибрионов, в 10 мл будет 1 080 вибрионов. На 10 чашках с посевами гомогената (посеян 1 мл) выросло 12 колоний, в 30 мл гомогената будет 360 колоний. Всего содержалось 1 440 вибрионов (100 %), неадгезировавшиеся вибрионы составили 75 %.

У иммунных животных должно наблюдаться статистически достоверное снижение адгезии вирулентного штамма холерного вибриона ($p = 0,05$ и менее).

**Приложение 12**
(обязательное)

## Требования к качеству экспериментальных животных

Поступивших в лабораторию кроликов перед началом исследований выдерживают в карантине не менее 10 сут. При этом контролируют их массу и температуру тела, внешний вид, аппетит. Состояние здоровья кроликов определяют также по результатам патолого-анатомического и гистологического исследований их внутренних органов и желудочно-кишечного тракта. Для этого по 3 кролика вскрывают и исследуют в день начала опыта и через 28 дней после проведения опыта. Кролики могут быть использованы в исследованиях в том случае, если за время карантина не снизилась масса их тела, ректальная температура не превышала 38,5 °С.

**Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона**

**Методические указания**
**МУ 3.3.1.2075—06**

Ответственный за выпуск С. В. Сенников

Редакторы Н. В. Кожока, Л. С. Кучурова, Е. И. Максакова
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 18.10.06

Формат 60 × 88/16 Печ. л. 4,25
Заказ 35

Тираж 500 экз.

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

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

gost.e-ecolog.ru