

ЛИТЕРАТУРА

1. Rychlik I., Gregorova D., H. Hradecka. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* 2006; 112: 1–10. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.030
2. Gregorova D., Pravcova M., Karpiskova R., Rychlik I. Plasmid pC present in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT14b strains encodes a restriction modification system // *FEMS Microbiology Letters*. 2002. 214. P. 195–198.
3. Boyd E.F., Hartl D.L. *Salmonella* virulence plasmid. Modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates // *Genetics*. 1998. 149. (3). 1183–1190.
4. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А., Якубич Т.В., Снеткова И.П. Формирование заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным *Salmonella* Enteritidis, в районах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства // *Журн. микробиол.* 2017; 1: 61–67.
5. Chen C.L., Wang C.Y., Chu C., Su L.H., Chiu C.H. Functional and molecular characterization of pSE34 encoding a type IV secretion system in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 34. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 57: 274–283. doi: 10.1111/j.1574.695X.2009.00612.x
6. Шубин Ф.Н., Маслов Д.В., Кузнецова Н.А. и др. Сальмонеллез в Сибири и на Дальнем Востоке: молекулярные и эпидемиологические аспекты / Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней. – Новосибирск: ЦЭРИС. 2009. С. 215–219.
7. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J Bacteriol.* 1981; 145: 1365–1373.
8. Раков А.В., Шубин Ф. Н., Кузнецова Н. А. Гетерогенность плазмид молекулярной массой 1,4 МДа в штаммах *Salmonella* Enteritidis // *Бюллетень СО РАМН*. 2013; 33(2): 10–15.
9. Соловьева А.С., Раков А.В., Кузнецова Н.А., Шубин Ф.Н. Эпидемиологическая характеристика сальмонеллеза, вызванного *Salmonella* Enteritidis 38:3,0:1,4 МДА // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016; 2 (65): 36–38.
10. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988. 26. 2465–2466.
11. Шубин Ф.Н., Ковальчук Н.И., Кузнецова Н.А. и др. Микробиологический мониторинг за *Salmonella* Enteritidis в Приморском крае. Фенотипическая и плазмидная характеристика возбудителя // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 1: 36–40.

Сведения об авторах

Шубин Феликс Николаевич, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии ФГБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», г. Владивосток; тел. 8(423)2442604, e-mail: shubin@inbox.ru;

Раков Алексей Владимирович, к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и микробиологии ФГБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», г. Владивосток; тел. 8(423)2442604, e-mail: vokar@mail333.com;

Соловьева Алина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии ФГБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», г. Владивосток; тел. 8(423)269-45-82, e-mail: dj_svet8525@mail.ru.

© Коллектив авторов, 2017 г.

doi: 10.5281/zenodo.817783

УДК 615.076.7, 615.371

И.В. Должикова¹, А.И. Тухватулин¹, Н.М. Тухватулина¹, И.П. Исачкова¹, И.Ф. Зотова¹, А.Ш. Джаруллаева¹, И.М. Евграфова¹, С.А. Попов², Д.Ю. Логунов¹

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ БЦЖ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ВАСТЕС MGIT 320

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, г. Москва;

² ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» МЗ РФ, Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, г. Москва

Количество жизнеспособных клеток бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) в различных образцах обычно исследуется методом посева на плотные питательные среды, в ходе которого анализируют количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Однако, несмотря на то, что этот метод является общепринятым стандартом, результаты исследований с его использованием могут широко варьировать из-за характерных особенностей микобактерий образовывать агрегаты. Более того, поскольку микобактерии БЦЖ относятся

к медленно растущим бактериям, анализ титра КОЕ занимает 5–7 недель. В настоящей работе мы разработали метод, позволяющий оценить количество жизнеспособных микобактерий БЦЖ в вакцинных препаратах в более короткие сроки (до 7 дней), основанный на использовании системы детекции роста микобактерий BACTEC™ MGIT™ 320. Исследования проводили на препарате вакцины БЦЖ, выпускаемым ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал «Медгамал»). Наши исследования показывают, что разработанный метод представляет адекватную альтернативу количественному учету КОЕ, независящему при этом от образования БЦЖ агломератов.

Ключевые слова: микобактерии, БЦЖ, КОЕ, BACTEC MGIT, анализ количества жизнеспособных микобактерий.

I.V. Dolzhikova¹, A.I. Tukhvatulin¹, N.M. Tukhvatulina¹, I.P. Isachkova¹, I.F. Zotova¹,
A.S. Dzharullaeva¹, I.M. Evgrafova¹, S.A. Popov², D.Y. Logunov¹

METHOD FOR QUANTIFICATION OF MYCOBACTERIUM BOVIS BCG BY USE OF THE BACTEC MGIT 320 SYSTEM

¹ Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya, Ministry of Health, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University Russian Ministry of Health, Research Institute of Phthisiopulmonology, Moscow, Russia.

Determination amount of mycobacterium BCG viable cells in different samples is usually performed by culturing on solid medium through analysing of colony forming units (CFU) titer. However, despite the fact that this method is an accepted standard, the results of studies with its use can vary widely due to the ability of mycobacteria to form agglomerates. Moreover, since BCG are slow-growing bacteria, CFU titer analysis can take up to five weeks. We have developed a method that allows to determine the number of viable mycobacteria BCG in vaccine formulations in a short period (up to 7 days), based on the use of BACTEC™ MGIT™ 320 system (Becton Dickinson). Research was carried out on samples of BCG vaccine, produced by Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya (branch «Medgamal»). Our research shows that the method is fast, accurate method of counting of viable bacilli in the vaccine BCG and may be discussed as an alternative replacement for method based on counting of CFU.

Keywords: mycobacteria, BCG, CFU, BACTEC, viable mycobacteria counting.

Введение

Микобактерии бациллы Кальмета-Герена (БЦЖ) представляют собой живой аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis*, который широко используется в мире в качестве вакцины против туберкулеза, а также в качестве иммунотерапевтического агента при лечении рака мочевого пузыря [1, 2, 3, 4]. Ежегодно в мире производится около миллиарда доз противотуберкулезной вакцины БЦЖ и около миллиона доз вакцины БЦЖ, используемой для лечения рака мочевого пузыря [5]. Несмотря на такое широкое использование, методы производства и анализа качества препарата вакцины БЦЖ не менялись в течение многих десятилетий.

Жизнеспособность клеток БЦЖ в вакцине является ключевым параметром, поскольку для индукции оптимального протективного иммунного ответа необходимы живые микроорганизмы в установленном титре [6, 7, 8]. Одним из стандартных методов контроля качества при производстве вакцины БЦЖ является анализ количества колониеобразующих единиц (КОЕ), который показывает количество жизнеспособных микобактерий в дозе препарата. Однако, несмотря на широкое применение этого метода, у него есть

существенные недостатки. Численный анализ КОЕ дает высоко вариабельные результаты из-за особенностей роста микобактерий, в частности, из-за тенденции к образованию бактериальных агломератов за счет наличия корд-фактора [9]. Более того, микобактерии БЦЖ относятся к медленно растущим микроорганизмам, что сказывается на временных затратах – анализ количества КОЕ БЦЖ занимает 5–7 недель. Трудности, возникающие при исследовании количества КОЕ БЦЖ, в конечном счете, могут повлиять на качество производства БЦЖ вакцины, в частности, на объем конечного продукта и на его стандартность.

В последние годы разрабатывается большое количество методов для быстрого анализа количества жизнеспособных бактерий, основанных на различных процессах, таких как анализ внутриклеточного количества АТФ [10, 11, 12, 13, 14], анализ восстановления солей тетразолия до формазанов (МТТ-тест) [15], анализ восстановления резазурина (резазурин-тест) [16]. Однако результаты, получаемые указанными выше методами, значительно зависят от многих факторов. Так, определение количества метаболитов, имеющих сравнительно короткий жизненный цикл и неравномерное внутриклеточное распределение, мо-

жет негативно сказаться на воспроизводимости получаемых результатов. Более того, методы МТТ-теста и резазурин-теста требуют многократных осадений исследуемого образца, что может привести также к искажению результатов исследования [15, 16].

Таким образом, существует необходимость разработки нового метода исследования количества жизнеспособных бактерий в вакцине БЦЖ, который бы позволял учитывать количество жизнеспособных бактерий в короткие сроки, при этом результаты которого не были бы сильно подвержены различным сопутствующим факторам.

В настоящее время для детекции микобактерий (в частности, микобактерий туберкулеза) широко применяется метод, основанный на использовании автоматической системы детекции роста микобактерий VASTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson, США). Работа прибора основана на использовании пробирок с жидкой питательной средой для культивирования микобактерий, на дне которых закреплен гасимый кислородом флюорохром. При снижении количества кислорода в питательной среде, прибор детектирует флюоресценцию и считает пробирку «положительной» (т.е. в ней индицируется рост микроорганизмов). Далее для подтверждения наличия микобактерий в «положительной» пробирке и отсутствия сторонней микрофлоры проводят дифференциальную окраску мазков (например, методом Циля-Нельсена). Поскольку работа прибора основана исключительно на детекции потребления кислорода в среде, нами было выдвинуто предположение о возможности использования данной системы для анализа количества жизнеспособных микобактерий в вакцине БЦЖ.

В данной работе приводится описание разработанного нами метода учета количества жизнеспособных клеток БЦЖ в вакцинных препаратах и примеры его применения на практике. Для анализа количества жизнеспособных микобактерий БЦЖ использовали вакцину БЦЖ, производимую ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал «Медгамал»). Наши исследования показывают, что разработанный метод является адекватной альтернативой стандартному методу определения КОЕ и не зависит от образования агрегатов БЦЖ.

Цель исследования

Разработать метод, позволяющий оценивать количество жизнеспособных микобактерий БЦЖ в более короткие сроки, чем общепринятый метод анализа КОЕ, и не зависящий от наличия бактериальных агрегатов.

Материалы и методы

Используемые штаммы бактерий

В работе были использованы различные серии вакцины БЦЖ (микобактерии БЦЖ штамм Россия, *Mycobacterium bovis* substrain BCG-1 Russia), предоставленные филиалом «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Наращивание бактериальной массы микобактерий БЦЖ, подготовка к анализу количества жизнеспособных микобактерий

Бактериальную массу БЦЖ наращивали в среде Миддлбрук 7Н9 (Becton Dickinson, США), обогащенной ростовой добавкой, содержащей олеиновую кислоту, альбумин бычий, декстрозу, каталазу (ОАДК) (Becton Dickinson, США). Для анализа гомогенности полученных образцов БЦЖ проводили специфическую окраску по методу Циля-Нельсена с помощью набора Stains for Acid Fast Staining (HiMedia Labs, Индия) согласно протоколу фирмы-производителя с последующей микроскопией на приборе Axio Lab.A1 (Zeiss, ФРГ). При микроскопии анализировали по 50 полей зрения для каждого образца, определяя общее количество микобактерий на поле зрения, количество бактериальных агрегатов, а также количество микобактерий в бактериальном агрегате.

Анализ КОЕ микобактерий БЦЖ

Для определения количества КОЕ БЦЖ в суспензии был произведен посев исследуемых образцов на скошенную питательную среду Левенштейна-Йенсена (Becton Dickinson, США). Инкубацию проводили при 37°C в течение 10 недель, после чего проводили визуальный подсчет выросших колоний.

Анализ количества жизнеспособных микобактерий, основанный на использовании автоматизированной системы для культивирования микобактерий VASTEC MGIT

Все результаты исследования жизнеспособности проводились на одном лоте индикаторных пробирок и ростовых добавок. Для определения количества жизнеспособных БЦЖ с помощью прибора VASTEC™ MGIT™ 320 (Becton Dickinson, США), исследуемые образцы (не менее трех повторов) засеивали в пробирки VASTEC MGIT, содержащие жидкую среду Миддлбрук 7Н9, с добавлением ОАДК, согласно инструкции к прибору VASTEC™ MGIT™ 320 и стандартной операционной процедуре (СОП) [17]. Далее пробирки помещали в прибор.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе Graph Pad Prism 5 и Excel. Для определения корреляции между полученными результатами и количеством КОЕ в исследуемых образцах использовали метод нелинейной (логарифмической) регрессии. При построении калибровочных кривых для подтверждения или опровержения описания возникающих закономерностей использовали коэффициент корреляции R^2 [18].

Результаты

Время детекции роста БЦЖ в VASTEC™ MGIT™ 320 прямо пропорционально количеству КОЕ в исследуемом препарате.

Автоматизированная система VASTEC™ MGIT™ 320 разработана для качественной детекции роста

микобактерий в различных образцах. Данная система основана на использовании пробирок с флюоресцирующим субстратом, чувствительным к количеству кислорода в среде. Достижение количества бактерий в пробирке с жидкой питательной средой порогового значения (в предварительных экспериментах нами было определено пороговое значение в 8×10^7 КОЕ/мл) инициирует флюоресценцию субстрата за счет снижения количества кислорода в среде. В это момент активируется детектор в приборе, который регистрирует время, прошедшее с момента посева образца в пробирку до момента регистрации в пробирке порогового флюоресцентного сигнала. Для определения корреляции между временем детекции роста БЦЖ в ВАСТЕС™ MGIT™ 320 и количеством внесенных в пробирку КОЕ нами был использован охарактеризованный производственный референс-препарат вакцины БЦЖ с известным количеством КОЕ. Данный препарат был использован

для приготовления серии разведений БЦЖ. После чего, в каждую пробирку было посеяно от 1 до 1×10^7 КОЕ в трех повторах.

Количество КОЕ в посевном материале дополнительно было подтверждено методом высева на скошенную среду Левенштейна-Йенсена. В результате эксперимента было показано, что время от момента посева до момента детекции жизнеспособных БЦЖ на системе ВАСТЕС™ MGIT™ 320 обратно пропорционально количеству внесенных микобактерий в пробирку (рис. 1). Следует отметить, что функция калибровочной кривой имеет высокий коэффициент корреляции ($R^2=0.9933$). Так, при внесении БЦЖ в количестве более 1×10^4 КОЕ результаты можно получить в срок до 10 дней (1,5 недели), при внесении более 1×10^4 КОЕ – до 7 дней, при этом порог детекции метода составляет 1 КОЕ. В то же время стандартный метод учета КОЕ вне зависимости от количества внесенных микобактерий занимает около 5 недель.

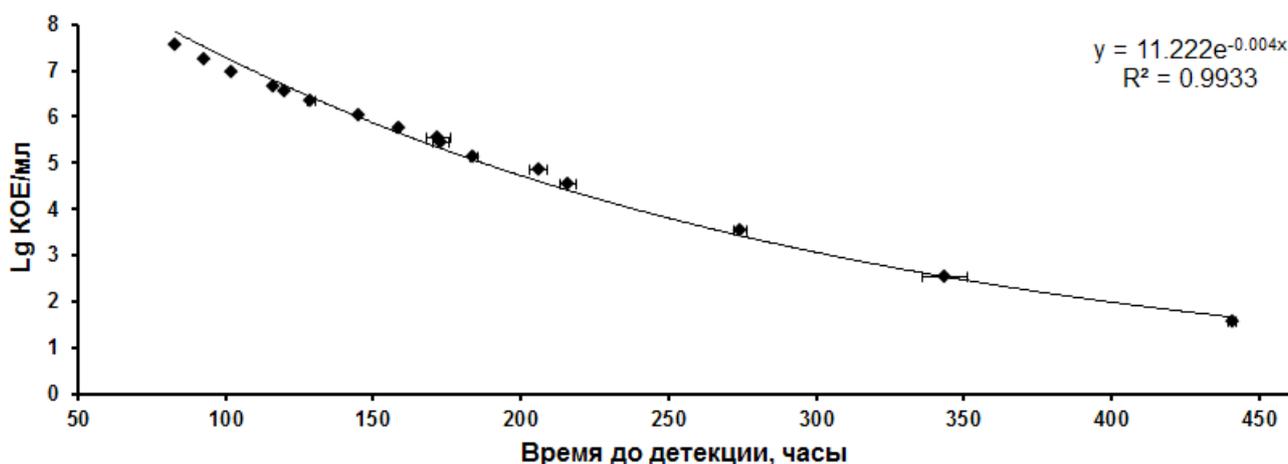


Рис. 1. Калибровочная кривая, с использованием референс-препарата вакцины БЦЖ, построенная по результатам анализа потребления кислорода с помощью прибора ВАСТЕС™ MGIT™ 320. На оси ординат обозначено количество вносимых микобактерий БЦЖ в виде \log_{10} концентрации БЦЖ (КОЕ/мл), по оси абсцисс – время до детекции микобактерий прибором (часы) (усредненное значение). На рисунке указаны средние значения времени, стандартные отклонения, уравнение, описывающее корреляционную функцию количества внесенных БЦЖ при посеве и времени до детекции, а также значение коэффициента корреляции R^2

Результаты количественного определения жизнеспособных БЦЖ в ВАСТЕС™ MGIT™ 320 не зависят от степени агрегации БЦЖ при культивировании

Особенность метода заключается в том, что в отличие от стандартного метода учета КОЕ на плотной питательной среде анализ на системе ВАСТЕС™ MGIT™ 320 зависит только от метаболической активности бактерий, что на практике может быть применено для оценки количества микобактерий в сложных ситуациях: например, при наличии бактериальных агрегатов или биопленок. В случае использования метода подсчета количества КОЕ ключевым фактором для точности измерений является гомогенность бактериальной суспензии. Наличие бактериальных агрегатов в исследуемом материале может негативно сказываться на результатах анализа КОЕ, занижая истинный титр микобактерий. При этом известно, что содержащиеся в клеточной стенке микобакте-

рий липиды (трегалозо-димиколаты, сульфолипиды) приводят к образованию бактериальных агрегатов. Для предотвращения образования агрегатов при посеве БЦЖ в жидкую среду к суспензии добавляют неионный детергент Твин 80 [19]. Кроме того, перед непосредственным подсчетом количества КОЕ полученную культуру БЦЖ подвергают гомогенизации с бусами или воздействию ультразвука [20].

Для проведения сравнительного анализа зависимости результатов подсчета КОЕ двумя исследуемыми методами от бактериальных агрегатов были получены образцы культуры БЦЖ выращенные без добавления и с добавлением Твин 80. После культивирования половина от каждого образца суспензии обрабатывалась ультразвуком. В приготовленных образцах проводился подсчет количества КОЕ БЦЖ методом высева на плотную питательную среду и методом с использованием прибора ВАСТЕС™

MGIT™ 320. Также каждый образец был использован для приготовления мазков, с окраской по методу Циля-Нельсена, для последующего анализа дисперсности образцов. Было определено, что образцы обработанные ультразвуком и детергентом практи-

чески не содержат агрегаты, единичные агрегаты содержатся в образцах обработанных каким-либо одним вариантом, наибольшее количество агрегатов наблюдалось в образце, не подвергнутом ни одному из исследуемых типов воздействий (рис. 2).

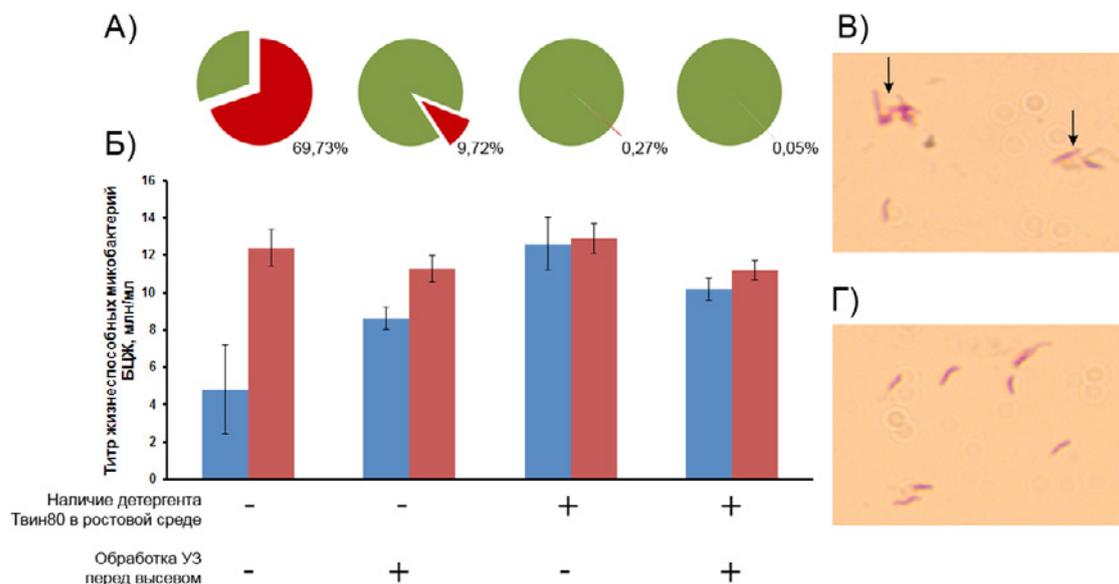


Рис. 2. Определение количества КОЕ БЦЖ в бактериальных суспензиях различной дисперсности двумя исследуемыми методами. А) Относительное количество КОЕ БЦЖ, находящихся в составе агрегатов, в бактериальных суспензиях подверженных различным воздействиям. Красным отмечена доля микобактерий БЦЖ, находящихся в составе агрегатов (% от общего количества БЦЖ), зеленым – находящихся в виде единичных клеток. Указано количество БЦЖ (%), находящихся в составе агрегатов. Б) Результаты анализа титра жизнеспособных микобактерий в живой культуре БЦЖ, подготовленных и исследованных различными методами. Синие столбцы – результаты, полученные методом посева БЦЖ на твердую питательную среду, красные столбцы – методом с использованием ВАСТЕС™ MGIT™ 320. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Микрофотография мазка (окрашивание по методу Циля-Нельсена) БЦЖ, культивированных без (В) и с детергентом (Г). Стрелками показаны бактериальные агрегаты

Результаты посева БЦЖ показали, что наименьшее количество КОЕ было определено в образце, полученном без детергента и необработанным ультразвуком – $4,8 \times 10^6$ КОЕ/мл (2,6 раз меньше чем в образце с детергентом и обработанным ультразвуком). Обработка ультразвуком увеличивала количество КОЕ в среднем в 1,8 раз ($8,68 \times 10^6$ КОЕ/мл), однако титр был значительно меньше такового в образцах, содержащих детергент обработанных и необработанных ультразвуком ($12,6 \times 10^6$ КОЕ/мл и $10,2 \times 10^6$ КОЕ/мл, соответственно). Результаты, полученные при использовании метода оценки количества жизнеспособных микобактерий с помощью системы ВАСТЕС™ MGIT™ 320, показали сравнимые титры во всех образцах независимо от обработки ультразвуком и присутствия детергента. Средний титр был также сравним с таковым полученным при посеве БЦЖ из образца содержащего детергент и обработанного ультразвуком.

Таким образом, можно заключить, что метод определения титра КОЕ высевом на твердые среды зависит от присутствия бактериальных агрегатов, что в итоге сказывается на искажении результатов анализа при невыполнении всех предварительных процедур. Тогда как метод с использованием прибора ВАСТЕС™ MGIT™ 320 не зависит от степени агрегации БЦЖ при культивировании.

Метод на основе ВАСТЕС™ MGIT™ 320 позволяет получить значения КОЕ с меньшей вариацией по сравнению с методом посева БЦЖ на твердые питательные среды

Для проведения сравнительного анализа сходимости получаемых результатов в ВАСТЕС™ MGIT™ 320 и методом посева БЦЖ на твердые питательные среды были использованы шесть аликвот, приготовленные из одного референс-препарата вакцины БЦЖ. Определение значения КОЕ в аликвотах, используя два исследуемых метода, показало, что при сравнимом среднем значении (метод посева – $2,1 \times 10^7$ КОЕ/мл, метод ВАСТЕС™ MGIT™ 320 – $2,2 \times 10^7$ КОЕ/мл) сходимость результатов при анализе титра жизнеспособных микобактерий разработанным нами методом выше (коэффициент вариации 1,13%), чем при анализе классическим методом (коэффициент вариации 4,53%) (рис. 3).

Применение метода для количественной характеристики микобактерий для анализа количества жизнеспособных микобактерий в вакцинных препаратах БЦЖ

Поскольку результаты анализа количества жизнеспособных микобактерий в гомогенных суспензиях БЦЖ, проанализированных разработанным нами и стандартными методами, совпадали, мы апробиро-

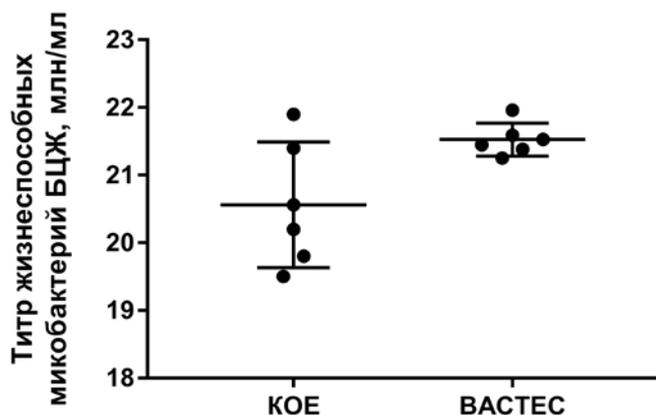


Рис. 3. Результаты анализа титра жизнеспособных микобактерий, определенных классическим методом высева БЦЖ на плотную питательную среду и предложенным нами методом на основе системы BACTEC™ MGIT™ 320. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения

вали метод на основе системы BACTEC™ MGIT™ 320 для анализа количества жизнеспособных микобактерий в вакцинных препаратах БЦЖ. На рисунке 4 представлены результаты анализа количества КОЕ микобактерий в образцах пяти независимых серий вакцины БЦЖ, полученных по стандартной методике методом высева на скошенную питательную среду Левенштейна-Йенсена, а также методом с использованием прибора BACTEC™ MGIT™ 320.

Как видно из представленных результатов, показатели жизнеспособности микобактерий в каждой серии вакцины БЦЖ, определяемые предложенным и стандартными методами, полностью совпадают. Все серии соответствуют регламентированному количеству КОЕ микобактерий в препарате. Следует обратить внимание, что время, затраченное на проведение исследования методом с использованием прибора BACTEC™ MGIT™ 320, составило около 7 дней, в то же время метод высева БЦЖ на скошенную питательную среду занял около 1,5 месяцев. Таким образом, можно заключить, что предложенный метод может быть использован для оценки качества вакцинных препаратов (для определения количества жизнеспособных микобактерий БЦЖ), позволяя получать результаты идентичные таковым по методу высева на твердые питательные среды, но в значительно более короткие сроки.

Обсуждение

Основным рекомендованным ВОЗ методом контроля качества вакцин БЦЖ является анализ титра КОЕ, основанный на визуальном подсчете количества колониеобразующих единиц после культивирования на плотных питательных средах [5]. Однако этот метод обладает рядом существенных недостатков, включая трудоемкость, длительность времени исполнения, а также присутствием ряда рисков, связанных, например, с возможностью контаминации питательной среды или же ее обезвоживания в силу того, что для проведения анализа требуется до 50 дней инкубации. Микобактерии БЦЖ в связи с

особенностями строения клеточной стенки (наличие корд-фактора) имеют тенденцию к образованию агрегатов, что значительно может исказить результаты анализа титра КОЕ, основанном на высеве на плотные питательные среды. Для предотвращения образования агрегатов суспензию бактерий подвергают гомогенизации и/или обработке ультразвуком. Но эти методы не гарантируют 100% удаления агрегатов, кроме того могут приводить к гибели части бактерий в суспензии.

Альтернативными методами исследования количества жизнеспособных микобактерий в препаратах вакцины БЦЖ, является анализ количества внутриклеточных метаболитов: АТФ [10, 11, 12, 13], оксидредуктаз [15], дегидрогеназ [16]. Методы, основанные на измерении этих метаболитов обладают рядом преимуществ: 1) время исследования снижается до 1–2 дней; 2) на титр жизнеспособных микобактерий не влияет присутствие бактериальных агрегатов. Однако, несмотря на перечисленные преимущества, указанные высокочувствительные методы требуют выполнения дополнительных трудоемких процедур. Кроме того, метаболиты могут некоторое время присутствовать вне клеток и проявлять свою активность, даже в случае гибели части клеток в суспензии.

В данной работе мы предположили возможность количественного определения жизнеспособных микобактерий в суспензиях БЦЖ, полученных в том числе из лиофилизированных препаратов (готовая вакцина БЦЖ). Нами был разработан метод оценки титра жизнеспособных микобактерий БЦЖ в вакцинных препаратах, позволяющий получить достоверные результаты в период до 7 дней в случае анализа вакцинных препаратов. Результаты оценки титра БЦЖ в различных образцах, полученные в ходе нашего исследования, свидетельствуют о том, что разработанный нами метод позволяет выявить количество жизнеспособных микобактерий БЦЖ в образцах с большой точностью и чувствительностью (минимальное количество БЦЖ в исследуемом образце – 1КОЕ), а также в сроки значительно более короткие, чем при определении титра КОЕ БЦЖ общепринятым методом высева (стандартный срок – 5 недель). Более того, важной особенностью разработанного метода является то, что результаты анализа не зависят от наличия бактериальных агрегатов, искажающих истинный титр.

Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее исследованиями в которых была показана возможность количественного учета микобактерий в бактериальных суспензиях живой культуры *Mycobacterium paratuberculosis* с помощью автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 [21].

Выводы

Разработанный метод оценки количества жизнеспособных микобактерий БЦЖ в вакцинных препаратах с использованием прибора BACTEC™

MGIT™ 320, обладает большей чувствительностью, точностью, меньшим временем исполнения и не зависит от образования агрегатов БЦЖ по сравнению со стандартным методом посева БЦЖ на твердые среды. В связи с этим, он может рассматриваться в качестве адекватной альтернативы существующим в настоящее время методам оценки количества живых микобактерий БЦЖ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа проведена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ (МК-2480.2017.7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Brandau S.H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed. Pharmacother.* 2007; 61: 299–305.
2. Brewer T.F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2000; Suppl. 3: S64–67.
3. Colditz G.A., Berkey B.T., Wilson C.S., Burdick M.E., Fineberg H.V., et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271: 698–702.
4. Gontero P., Malmstrom B.A., O'Donnell P.U., Oderda M.A., Sylvester M.R., et al. The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.* 2010; 57: 410–429. doi: 10.1016/j.eururo.2009.11.023
5. WHO. BCG Vaccine. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2004; 79: 27–38.
6. Brennan M.J., C.F., Morris S.L. Propelling novel vaccines directed against tuberculosis through the regulatory process. *Tuber. Lung Dis.* 1999; 79: 145–151. doi: 10.1054/tuld.1998.0199
7. Orme I.M. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* 1988; 56: 3310–3312.
8. Parra M., Lim Y.A., Kolibab K.J., Derrick S., Cadieux N., et al. Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1025–1032. doi: 10.1128/CVI.00067-09.
9. Sattler T.H., Youmans G.P. The Effect of «Tween 80» Bovine Albumin, Glycerol, and Glucose on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (H37Rv). *J Bacteriol.* 1948; 56: 235–243.
10. Askgaard D.S., Knudsen G.A., Bennedsen, K.J. Firefly luciferase assay of adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines. *Biologicals.* 1995; 23: 55–60.
11. Ho M.M., Rigsby M.K., Jensen S.E., Gairola S., Seki M., et al., Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. *Vaccine* 2008; 26: 4754–4757. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.026.
12. Jensen S.E., Klein H.P., Hasløv B.M., Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine. *Biologicals*, 2008; 36: 308–314. doi: 10.1016/j.biologicals.2008.05.001.
13. Prioli R.P., Brown T.A. Rapid methods for counting mycobacteria – comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay. *Tubercle.* 1985; 66: 99–108.
14. Imamura H., Togawa N.K., Saito H., Iino K.R., Kato-Yamada Y., et al., Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106: 15651–15656. doi: 10.1073/pnas.0904764106.
15. Kairo S.K., Bedwell J., Tyler P.C., Carter A., Corbel M.J. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine.* 1999; 17(19): 2423–2428.
16. Taneja N.K., Tyagi J.S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(2): 288–293.
17. Попов С.А., Пузанов В.А., Rusch-Gerdes S., Siddiqi S.H. Система MGIT для культуральной диагностики и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза. Стандартные операционные процедуры. – М.: BD, 2007. 24 с.
18. Motulsky H. Statistical analyses for laboratory and clinical researchers. *Graph Pad Prism Statistics Guide*, 2005. pp. 92–95.
19. Wayne L.G., Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for Research Purposes in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. In: Bloom, B.R. (Ed.), ASM Press, Washington DC 1994. pp. 74–83.
20. Stokes R.W., Norris-Jones R., Brooks D.E., Beveridge T.J., Doxsee D., Thorson L.M. The glycan-rich outer layer of the cell wall of mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun.* 2004; 72: 5676–5686. doi: 10.1128/IAI.72.10.5676-5686.2004
21. Shin S.J., Han J.H., Manning E.J., Collins M.T. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(6): 1941–1948.

Сведения об авторах

Должикова Инна Вадимовна, м.н.с.. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, i.dolzhikova@gmail.com;

Тухватулин Амир Ильдарович, с.н.с., к.б.н. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, amir_tuhvatulin@yahoo.com;

Тухватулина Наталья Михайловна, н.с., к.б.н. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, tuhvatulina_n@mail.ru;

Исачкова Ирина Петровна, начальник отделения филиала «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-193-30-50, irinai-bcg@yandex.ru;

Зотова Ирина Федоровна, Научный сотрудник, к.б.н. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России. i.fedorovna@gmail.com; 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11;

Джаруллаева Алина Шахмировна, м.н.с. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, alina-dzharullaeva@yandex.ru;

Евграфова Ирина Михайловна, м.н.с. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, iriskagamal@gmail.com;

Попов Сергей Александрович, заведующий лабораторией, к.м.н., НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова; 127994, Россия, Москва, ул. Достоевского, дом 4, 8-495-681-02-33, popov_s55@mail.ru;

Логунов Денис Юрьевич, заведующий лабораторией, член-корр. РАН, д.б.н. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8-499-190-76-11, ldenisy@yahoo.com.

© Коллектив авторов, 2017 г.

doi: 10.5281/zenodo.818164

УДК 615.375:578.832.1;577.114:582.272

Т.А. Кузнецова¹, Л.А. Степанова², С.П. Ермакова³

ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОГО ВИРУСА ГРИППА А/КАЛИФОРНИЯ/7/09 (H1N1) ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ FUCUS EVANESCENS

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток

² НИИ гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Цель исследования: изучение влияния сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens* на иммунный ответ к инактивированному вирусу гриппа A/California/7/09 H1N1pdm. *Материалы и методы:* мышей BALB/c иммунизировали дважды инактивированным вирусом пандемического гриппа A/California/7/09 H1N1pdm09 с фукоиданом. В сыворотке крови определяли уровень гемагглютинирующих антител к вирусу гриппа в РТГА через 2 недели после однократной и двукратной иммунизации. *Результаты:* при первичной и вторичной иммунизации фукоидан оказывал адъювантный эффект, стимулируя формирование антител к вирусу гриппа А. В ответ на введение вируса в дозе 5 мкг/мышь титры антител не различались по сравнению с введением 15 мкг/мышь, что важно для выбора вакцинирующей дозы. Эффект фукоидана на формирование антител к вирусу гриппа был выражен в большей степени по сравнению с традиционным лицензированным адъювантом гидроксидом алюминия. *Выводы:* добавление фукоидана к инактивированному вирусу гриппа – экспериментальному аналогу вакцинного штамма – значительно повышает его иммуногенность, что свидетельствует о перспективности использования фукоидана в качестве адъюванта в составе противогриппозных вакцин.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, фукоиданы, адъюванты, вакцины, вирус гриппа.

Т.А. Kuznetsova¹, L.A. Stepanova², S.P. Ermakova³

INCREASING THE IMMUNOGENICITY OF THE INACTIVATED INFLUENZA VIRUS A/CALIFORNIA/7/09 (H1N1) USING AS ADJUVANT FUCOIDAN FROM BROWN ALGA FUCUS EVANESCENS

¹ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

² Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia