

шей доступностью коровьего ЛФ представляются более перспективными, особенно при лечении антибиотикорезистентных форм бактериальной и кандиды-инфекций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зорина В.Н., Зорин Н.А. Белковые компоненты врожденного иммунитета в защите от патогенной инвазии. Журн. микробиол. 2013, 3: 111-117.
2. Acosta-Zaldívar M., Andrés M.T., Rego A. et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Apoptosis. 2016, 21(2): 163-173. doi: 10.1007/s10495-015-1199-9.
3. Chen P.W., Jheng T.T., Shyu C.L., Mao F.C. Synergistic antibacterial efficacies of the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with probiotic secretion in curbing the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 2013, 62 (Pt 12): 1845-1851. doi: 10.1099/jmm.0.052639-0.
4. El-Fakharany E.M., Sánchez L., Al-Mehdar H.A., Redwan E.M. Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: comparison study. Virol. J. 2013, 10: 199. doi: 10.1186/1743-422X-10-199.
5. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. Pharmaceuticals (Basel). 2016, 9 (4). pii: E61.
6. Schryvers A.B., Gonzalez G.C. Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. Infect. Immun. 1989, 57 (8): 2425-2429.
7. Sharma S., Sinha M., Kaushik S. et al. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. Biochem Res. Int. 2013; 2013: 271641. doi: 10.1155/2013/271641.
8. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. et al. Immunomodulatory effects of lactoferrin. Acta Pharmacol Sin. 2014, 35 (5): 557-566. doi: 10.1038/aps.2013.200.
9. van der Does A.M., Bogaards S.J., Jonk L. et al. The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced TLR-mediated immune response. Biometals. 2010, 23 (3): 493-505. doi: 10.1007/s10534-010-9322-4.

Поступила 15.10.17

Контактная информация: Зорина Вероника Николаевна, д.б.н., 654007, Новокузнецк, пр. Строителей, 5, р.т. (3843)45-84-18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.В.Отрашевская*<sup>1</sup>, *В.Н.Винокурова*<sup>1</sup>, *Е.А.Шитиков*<sup>2</sup>,  
*Е.А.Сотникова*<sup>2</sup>, *Т.А.Перевышина*<sup>1</sup>, *С.А.Колченко*<sup>2</sup>, *Т.Б.Бутусова*<sup>2</sup>,  
*Е.С.Кострюкова*<sup>2</sup>, *Е.Н.Ильина*<sup>2</sup>, *Г.М.Игнатьев*<sup>1,3</sup>

#### **ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СУБ-ШТАММА *M. BOVIS* VCG-1 (RUSSIA) В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ БЦЖ**

<sup>1</sup>НПО «Микроген», Москва; <sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов

*Цель.* Изучение структуры генома и анализ стабильности генетических свойств субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia), применяемого для производства вакцин. *Материалы и методы.* Было проведено полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий. Молекулярно-биологическими методами был проведен анализ числа тандемных повторов (VNTR) по 24 локусам и сполиготипирование. *Результаты.* Последовательность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) рабочего посевного банка была полностью собрана, аннотирована и депонирована в базу GenBank. Анализ DU2- и RD-регионов подтвердил принадлежность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) к группе DU2-I, BCG Russia.

Полногеномное выравнивание образцов суб-штамма производственных серий вакцины на геном *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего банка не выявило структурных отличий. Сполиготипирование и VNTR-профиль также продемонстрировали идентичность структур. *Заключение.* Результатом проведенного исследования явилось как подтверждение подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), так и демонстрация его генетической стабильности в процессе производства вакцины БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность генома суб-штамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 58—67

Ключевые слова: *M. bovis* BCG-1 (Russia) суб-штамм, подлинность, стабильность генома

*E.V.Otrashevskaya*<sup>1</sup>, *V.N.Vinokurova*<sup>1</sup>, *E.A.Shitikov*<sup>2</sup>,  
*E.A.Sotnikova*<sup>2</sup>, *T.A.Perevyshina*<sup>1</sup>, *S.A.Kolchenko*<sup>2</sup>, *T.B.Butusova*<sup>2</sup>,  
*E.S.Kostruyukova*<sup>2</sup>, *E.N.Ilina*<sup>2</sup>, *G.M.Ignatev*<sup>1,3</sup>

## **M. BOVIS BCG-1 (RUSSIA) SUB-STRAIN GENOME STABILITY INVESTIGATION WITHIN THE ENTIRE PRODUCTION PROCESS**

<sup>1</sup>Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; <sup>2</sup>Federal Scientific and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow; <sup>3</sup>St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera and the Bacterial Preparations Factory, Russia

*Aim.* The aim of the current study was to analyze the genome structure of the *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain, used for the vaccine production, as well as its genome stability within the entire production process. *Materials and methods.* Whole genome sequencing and *M. bovis* BCG-1 (Russia) working seed lot and for the last production passage of the sub-strain cultivation from a number of the vaccine batches. Additionally, VNTR sequences of 24 locus analyses, RD patterns comparison, as well as spoligotyping were performed. *Results.* The whole genome sequence of the *M. bovis* BCG-1 (Russia) working seed lot was assembled, annotated and deposited to GenBank. On the basis of DU2- and RD-regions analyzes *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain was confirmed to be belonged to BCG Russia strains of DU2-I group. Whole genome sequencing followed by comparative analysis of RD patterns and SNPs confirmed the stability of the vaccine sub-strain genome from the working seed lot to a number of the vaccine batches obtained within the two-years period. VNTR profile and spoligopattern exactly matched the *M. bovis* BCG-1 (Russia). *Conclusion.* Thus the *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain genome identity and stability have been studied and demonstrated. The obtained result confirmed the vaccine production process consistency.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 58—67

Key words: *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain, identity, genome stability

## **ВВЕДЕНИЕ**

Вакцина БЦЖ (бациллы Кальметта-Герена) существует на протяжении почти 100 лет и является одной из наиболее используемых в настоящее время вакцин, охватывая более 90% новорожденных и детей грудного возраста в странах, где она является компонентом национальной программы иммунизации детей [23]. Все существующие вакцинные суб-штаммы имеют происхождение от первоначального изолята *M. bovis*, который Кальметт и Герен пассировали в течение 13 лет. В результате последующих пассажей штамма в различных условиях были получены разнообразные вакцинные суб-штаммы

BCG с фенотипическими и генотипическими различиями [23]. В плане эффективности ни один суб-штамм BCG не обладает явными преимуществами перед другими [22]. ВОЗ признала необходимость молекулярно-генетической характеристики всех вакцинных суб-штаммов *M. bovis* BCG в связи с их разнообразием [9, 24]. На данном этапе разработаны и полностью охарактеризованы четыре референсных штамма *M. bovis* BCG: Danish 1331, Tokyo 172-1, Russian BCG-1 и Moreau RDJ [15, 22, 24].

Согласно Европейской Фармакопее VIII и Фармакопее РФ XIII подтверждение подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG должно проводиться не только традиционными методами, но и молекулярно-биологическими, в качестве дополнительных. На данном этапе ВОЗ предлагает использовать для подтверждения подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG мультиплексную ПЦР, которая позволяет анализировать шесть регионов генома [15, 22, 23]. Однако так как данный метод не позволяет выявлять возможные мутации в иных регионах генома, ВОЗ также рекомендует более тщательное изучение генетической стабильности производственных суб-штаммов *M. bovis* BCG иными молекулярно-биологическими методами [9]. Во избежание возникновения фенотипических изменений суб-штаммов *M. bovis* BCG ВОЗ также рекомендует всем производителям ограничить количество пассажей между главным и рабочим посевными банками и мониторировать генетическую стабильность суб-штамма в процессе производства от главного банка и до конечного продукта [24].

Целью настоящего исследования явилось изучение структуры генома и анализ стабильности генетических свойств *M. bovis* суб-штамм BCG-1 (Russia), применяемого для производства вакцин БЦЖ и БЦЖ-М НПО «Микроген». Для достижения поставленной цели было проведено полногеномное секвенирование и сравнительный геномный анализ образцов суб-штамма от рабочего посевного банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2014 году были исследованы образцы суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего посевного банка и образцы последнего пассажа производственного культивирования одной производственной серии вакцины БЦЖ (филиал «Аллерген», Ставрополь). Рабочий посевной банк был наработан из вакцинного штамма *M. bovis* суб-штамм BCG-1 (Russia), полученного от НЦ ЭСМП (№ 70001, посевная серия 368 «щ», 2006 г.). Последним пассажем производственного культивирования суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в соответствии с производственным регламентом являлся шестой пассаж.

В 2015 году для исследования были взяты образцы последнего шестого пассажа производственного культивирования суб-штамма BCG-1 (Russia) десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М (НПО «Микроген»). Данные серии вакцин были наработаны из исследованного в 2014 году рабочего посевного банка.

Сбор материала для исследования проводился путем отделения микробной массы от культуральной среды на фильтровальной бумаге, отмывания культуры 0,9% раствором натрия хлорида и дальнейшим сбором микробной массы в микроцентрифужные пробирки микробиологическими петлями. Собранный материал хранился при температуре  $\leq +4^{\circ}\text{C}$ .

Выделение тотальной геномной ДНК из всех образцов производственной культуры *M. bovis* BCG-1 (Russia) было осуществлено с использованием набора «ПРОБА-НК» («ДНК-Технология», Москва) согласно инструкции производителя.

Определение полногеномной последовательности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) из образцов рабочего посевного банка, а также образцов *M. bovis* BCG-1 (Russia) последнего пассажа одного производственного цикла 2014 г. было проведено методом секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора GS FLX+ (Roche, США). Фрагментные библиотеки были получены в соответствии с протоколом производителя (Rapid Library Preparation Method Manual GS FLX+ Series — XL+, Roche, США) с использованием коммерческого набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche, США). Дополнительно для образцов было проведено секвенирование с использованием прибора Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Для этого были получены две библиотеки парных фрагментов (с размером библиотеки 2000–3000 п.о. и 5000–6000 п.о.) с помощью коммерческого набора 5500 SOLiD Mate-Paired Library Construction Kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом Ion Mate-Paired Library Preparation (Life Technologies Demonstrated Protocol). Для сборки геномов *de novo* использовалась программа GS De Novo assembler version 2.9. Объединение полученных контигов в скаффолды осуществлялось с помощью программы SSPASE [5].

Полногеномную последовательность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) из образцов десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М 2015 г. определяли с использованием секвенатора ionTorrent PGM (Life Technologies). Фрагментные библиотеки были получены с использованием коммерческого набора Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Каждый из геномов был секвенирован в среднем с 14-кратным покрытием.

Для сравнительного анализа были использованы данные полногеномного секвенирования двух суб-штаммов BCG Russia, GenBank №ERR766224 [1] и BCG Russia, GenBank №SRR398629 [17]. Дополнительно были использованы геномные последовательности *M. bovis* BCG Tokyo 172, GenBank №AP010918.1, и *M. bovis* BCG Moreau RDJ, GenBank №AM412059.2, относящиеся к группе DU2-1, а также *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, GenBank №AM408590.1, *M. bovis* AF2122/97, GenBank №NC\_002945.4 и *M. tuberculosis* H37Rv, GenBank №NC\_000962.3.

Картирование чтений с прибора на геномы *M. bovis* BCG Pasteur и *M. tuberculosis* H37Rv осуществлялось с помощью инструмента bowtie2 [11]. Анализ данных выравнивания проводился в приложении samtools 0.1.19 [13]. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов осуществлялся с помощью программы VarScan v 2.3.1 [10]. Выравнивание и поиск замен в образцах, представленных полногеномными последовательностями, осуществлялся с помощью программного пакета MUMMER 3 [8].

Для анализа делетированных последовательностей, так называемых регионов различия (Region of Difference; RD), проводилось сравнение покрытия анализируемого региона с покрытием фланкирующих участков. В соответствии с ранее опубликованным исследованием [2] был проведен сравнительный анализ основных RD-регионов, отличающихся как между представителями первой (DU2-1) группы, так и от штамма *M. bovis* BCG Pasteur. Дополнительно

были определены размеры отдельных RD-регионов согласно проведенному ранее исследованию [3].

Результаты сборки de novo с применением программы GS De Novo assembler version 2.9 использовались для определения количества и локализации повторяющегося элемента IS6110.

Анализ числа tandemных повторов в различных локусах генома (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR) для суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») проводился по 24 локусам с использованием праймеров, описанных ранее [21]. Сполиготипирование исследуемых образцов производственного суб-штамма проводилось, как описано ранее [4]. Для геномов суб-штамма BCG Russia (GenBank №ERR766224 и №SRR398629), представленных в виде чтений с прибора, сполиготип определялся с использованием программы SpolPred [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*1. Подтверждение подлинности вакцинного суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»). В ходе исследования было проведено полногеномное секвенирование суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») из образцов рабочего посевного банка. Суммарное количество контигов при сборке чтений фрагментной библиотеки составило 81, покрытие — 54. На следующем этапе обработки данных было проведено объединение контигов в скаффолды с использованием чтений с библиотек парных фрагментов. В результате проведенной работы для генома M. bovis BCG-1 (Russia) было получено 8 скаффолдов. Дальнейшее «закрытие» генома производственного суб-штамма было осуществлено с использованием секвенирования по Сэнгеру. Полногеномная последовательность суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») депонирована в базу GenBank под номером №CP013741.1.*

*1.1 Анализ структуры генома суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»). Для M. bovis BCG-1 (Russia), так же как и для M. bovis BCG Tokyo 172 и BCG Moreau RDJ, была проанализирована дупликация DU2, которая лежит в основе классификации вакцинных штаммов BCG [6]. В геноме M. bovis BCG-1 (Russia) дублированный участок имеет протяженность 20704 п.н. и включает 20 генов (Rv3299c-Rv3317, аннотация по M. tuberculosis H37Rv). Такие границы также характерны для ранних штаммов BCG Tokyo 172 и BCG*

Таблица 1. Сравнение RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 Russia (НПО «Микроген») и других суб-штаммов группы DU2-1 относительно штамма BCG Pasteur 1173P2

Регион отличия	Коорд. по H37Rv	Суб-штаммы <i>M. bovis</i>					
		BCG-1 (Russia) (рабочий банк НПО «Микроген»)	BCG Russia (ERR766224)	BCG Russia (SRR398629)	Moreau RDJ	Tokyo 172	Pasteur 1173P2
RD2	2221057-2231845	+	+	+	+	+	—
RD14	1998225-2007297	+	+	+	+	+	—
nRD18	1332920-1334466	+	+	+	+	+	—
PhoP ins IS6110	852067-852068	+	+	+	+	+	—
RD Japan	3825027-3825048	+	+	+	+	—	+
RD16	3817365-3824973	+	+	+	—	+	+
ΔfadD26-ppsA	3244503-3245478	—	—	—	+	—	—
RD Moreau (ΔRv3887c)	4370517-4371645	—	—	—	+	—	—
RD Russia	4140085-4141688	—	—	—	+	+	+

Moreau RDJ, образующих вместе с BCG Russia группу DU2-I. При этом в геноме BCG Russia и BCG Tokyo 172 дупликация DU2 состоит из трех копий, а в геноме Moreau RDJ из двух. В свою очередь, DU2 BCG Pasteur имеет длину 36163 п.н., относится к группе DU2-IV и образуется в результате дупликации более протяженного фрагмента, чем в случае DU2-I и двух последующих делеций [6].

Результаты исследования основных RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), а также сравнительный анализ их наличия/отсутствия в суб-штаммах *M. bovis* BCG первой (DU2-I) группы представлены в табл. 1. Полученные в результате проведенных исследований данные суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) совпали с ранее опубликованными данными для *M. bovis* BCG Russia [2, 12].

Результаты определения размеров отдельных RD-регионов представлены в табл. 2. Как видно из табл., суб-штамм *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»), как и другие представители BCG Russia, может быть дифференцирован от суб-штаммов *M. bovis* BCG Tokyo 172 и *M. bovis* BCG Moreau RDJ по локусам RD16 и *senX3-regX3*.

Полученные результаты подтверждают принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») к группе DU2-I, в целом, и к подгруппе *M. bovis* BCG Russia, в частности, и позволяют проводить дифференцирование суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia, в целом, внутри группы DU2-I с достаточной степенью точности.

**1.2 Анализ количества тандемных повторов (VNTR) в различных локусах генома *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») и споллиготипирование.** В ходе исследования была установлена структура DR (direct repeat, прямые повторы) региона для исследуемого суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). Споллигопаттерн штаммов содержал спейсеры 1, 2, 4–8, 10 – 15, 17 – 31, 25 и 32 – 38 (SIT 482 по международной базе данных SITVIT WEB) ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE)). Между 24 и 25 спейсерами была расположена последовательность IS6110 элемента.

Для определения VNTR-профиля *M. bovis* BCG-1 (Russia) в дополнение к результатам полногеномного секвенирования была использована 24-локусная система типирования *M. tuberculosis*. Результаты исследования суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), а также сравнительный анализ с другими образцами *M. bovis* BCG представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, локус 2461 суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) и суб-штамма *M. bovis* BCG Tokyo 172 содержат по 5 копий повтора, тогда как у суб-штамма *M. bovis* BCG Moreau RDJ – 3 копии. В свою очередь, локус 4052 штаммов *M. bovis* BCG Russia и *M. bovis* BCG Moreau RDJ содержит 5 копий повтора, в отличие от штамма *M. bovis* BCG Tokyo 172, содержащего 4 копии повтора, что согласуется с ранее опубликованными данными [18]. По локусу VNTR 580 суб-штаммы *M. bovis*

Таблица 2. Сравнительный анализ размеров RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») относительно других суб-штаммов группы DU2-I

Суб-штамм <i>M. bovis</i>	Регион отличия* (п.о.)					
	RD1	RD2	RD8	RD14	RD16	<i>senX3-regX3</i>
BCG-1 (Russia) (рабочий банк НПО «Микроген»)	193	315	472	252	401	276
BCG Russia (GenBank №ERR766224)	193	315	472	252	401	276
BCG Russia (GenBank №SRR398629)	193	315	472	252	401	276
BCG Tokyo 172	193	315	472	252	379	353
BCG Moreau RDJ	193	315	472	252	—	276

Примечание. \*Как описано ранее [2].

BCG-1 (Russia) и *M. bovis* BCG Moreau RDJ содержат равное количество копий повтора (два), что отличает их от суб-штамма *M. bovis* BCG Токуо 172, содержавшего 3 копии. Полученные по локусу VNTR 580 результаты согласуются с ранее опубликованными данными [14]. Полученный VNTR профиль *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») подтверждает принадлежность суб-штамма к группе DU2-1.

**1.3 Анализ однонуклеотидных полиморфизмов *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»).** В ходе сравнительного анализа производственного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) и других представителей группы DU2-1 относительно генома *M. bovis* BCG Pasteur1173P2 было обнаружено 23 полиморфизма, которые также характерны для других суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224 и №SRR398629). Из них 4 SNPs находились в межгенных областях генома: C204726T, C207243T, G1165130A и C2645769T. Из мутаций, найденных в кодирующей области генома *M. bovis* BCG Russia, всего одна была синонимичной, а 18 приводили к несинонимичным заменам. При этом два полиморфизма относились к нонсенс-мутациям и вели к образованию стоп-кодона — BCG\_0237 (S123\*) и BCG\_0908 (Q64\*). Результаты проведенного сравнительного исследования подтверждают принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) к группе *M. bovis* BCG Russia.

При сравнительном анализе суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia в каждом были найдены штаммо-специфические полиморфизмы. Для суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») была обнаружена синонимичная замена в гене *glnD*. Для суб-штамма *M. bovis* BCG Russia (GenBank №SRR398629) была идентифицирована синонимичная замена в гене Rv0383c, а для суб-штамма *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224) мутации были обнаружены в гене *rhoR* двухкомпонентной системы PhoP-PhoR и в гене PE\_PGRS27.

**2. Подтверждение стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») в процессе производственного культивирования.** Для исследования стабильности генома *M. bovis* BCG-1 (Russia) было проведено полногеномное секвенирование образцов суб-штамма последнего пассажа производствен-

Таблица 3. Сравнительный анализ VNTR-профиля суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») относительно других суб-штаммов группы DU2-1

Суб-штамм <i>M. bovis</i>	VNTR-локус*																							
	154	580	960	1644	2059	2531	2687	2996	3007	3192	4348	802	424	577	1955	2163	2165	2347	2401	2461	3171	3690	4052	4156
BCG Pasteur 1173P2	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	6	1	3	5	2	2	5	3	2	5	0
BCG Токуо 172	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	5	3	2	4	0
BCG Moreau RDJ	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	3	3	2	5	0
BCG-1 (Russia) (рабочий банк)	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	5	3	2	5	0

Примечание. \* Как описано ранее [19].

ной серии вакцины БЦЖ 2014 г. по схеме, аналогичной для образцов рабочего посевного банка *M. bovis BCG-1 (Russia)* (Материалы и методы). Суммарно геном *M. bovis BCG-1 (Russia)* был прочитан со 115-кратным покрытием. В ходе обработки данных было получено 6 скаффолдов. Полногеномное выравнивание исследуемых образцов последнего производственного пассажа на геном суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* рабочего банка не выявило структурных изменений как на уровне RD-регионов, так и на уровне однонуклеотидных полиморфизмов. Результаты сравнительного анализа DR региона (сполиготипирование) и VNTR профиля суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* на разном уровне производственного культивирования также продемонстрировали идентичность суб-штамму *M. bovis BCG-1 (Russia)* рабочего посевного банка, депонированному ранее в базу данных NCBI (GenBank №C3013741.1). Таким образом, в ходе сравнительного анализа было определено полное совпадение геномов производственного суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* (НПО «Микроген») от рабочего банка до последнего пассажа производственного культивирования (до этапа лиофилизации).

Полногеномное выравнивание образцов производственного суб-штамма десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М (НПО «Микроген») 2015 г. на геном *M. bovis BCG-1 (Russia)* рабочего банка также не выявило структурных изменений как на уровне RD-регионов, так и на уровне однонуклеотидных полиморфизмов. Сполиготипирование и VNTR-профиль суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* десяти производственных серий 2015 г. также продемонстрировали идентичность относительно друг друга и относительно суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* рабочего посевного банка. Результаты сравнительного анализа полногеномных последовательностей образцов десяти производственных серий суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* депонированы в базу GenBank под номером №PRJNA3862621.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время все большее значение в паспортизации вакцинных штаммов вирусов и бактерий и соответственно в аттестации производственных банков вакцинных штаммов придается молекулярно-биологическим методам. Наибольшее развитие среди них получили амплификационные технологии, позволяющие достаточно быстро провести идентификацию (подтверждение подлинности) исследуемого штамма. При этом стоит отметить, что данные методы позволяют анализировать лишь небольшую часть генома. Полногеномное секвенирование дает исчерпывающую информацию о последовательности и структуре всего генома исследуемого штамма и может быть использовано как для подтверждения подлинности, так и для оценки стабильности исследуемого штамма.

Для подтверждения подлинности вакцинного суб-штамма *M. bovis BCG-1 (Russia)* (НПО «Микроген») методами сравнительной геномики был проведен анализ геномной организации штамма, а также однонуклеотидных полиморфизмов относительно представителей группы DU2-I, а также референсных геномов *M. bovis BCG Pasteur* и *M. tuberculosis H37Rv*. Исходя из анализа DU2- и RD-регионов было подтверждено, что суб-штамм *M. bovis BCG-1 (Russia)* (НПО «Микроген») относится к «ранним» вакцинным суб-штаммам группы DU2-I, *M. bovis BCG Russia*. Суб-штамм *M. bovis BCG-1 (Russia)* имел, как и другие представители *M. bovis BCG Russia* [2, 17], включая *M. bovis BCG Sofia SL222* [20], характерную делецию RDRussia. Данная делеция, впервые описанная Mostowy S. et al. [16], имеет протяженность 1603 п.н.

и затрагивает гены Rv3697c, Rv3697A, Rv3698 (согласно аннотации *M. tuberculosis* H37Rv).

Для более детального анализа суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») были дополнительно определены размеры шести отдельных локусов, как было опубликовано ранее [3]. Данный подход также позволяет дифференцировать суб-штаммы внутри группы DU2-I и удовлетворяет критериям точности, надежности и воспроизводимости, рекомендованным ВОЗ.

В результате проведенного исследования были получены данные, полностью согласующиеся с ранее опубликованными [2, 3, 15, 17, 20], что подтверждает принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») к группе DU2-I, в целом, и к подгруппе *M. bovis* BCG Russia, в частности.

Для оценки возможных микроэволюционных изменений суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») был проведен поиск однонуклеотидных полиморфизмов как в самом образце, так и в других представителях группы *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224, №SRR398629) относительно штамма *M. bovis* BCG Pasteur. Большинство полиморфизмов (N=23), общих для проанализированных в данном исследовании штаммов *M. bovis* BCG Russia, было найдено и в исследованных образцах суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). При этом была выявлена всего одна синонимичная мутация в гене *glnD*, отличающая *M. bovis* BCG-1 (Russia) от других представителей *M. bovis* BCG Russia [2, 17].

Генетическая стабильность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) была изучена на разных уровнях в соответствии с рекомендациями ВОЗ [9, 23]. Рекомендованное ВОЗ сравнительное исследование VNTR-профилей и RD-регионов, а также элемента IS6110 [9] выявило полную идентичность всех производственных образцов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). Сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов также не выявил различий. При этом специфическая для *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») мутация в гене *glnD* сохранялась на всех пассажах культивирования суб-штамма в течение всего двухлетнего периода мониторинга стабильности генома. Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрирована генетическая стабильность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе одного производственного цикла, а также в процессе производства десяти последовательных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность генома вакцинного суб-штамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

Результаты исследования генетической стабильности генома вакцинного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) как ранее опубликованные [1, 19], так и представленные в данном исследовании позволяют вносить в паспорта посева серий суб-штамма информацию о генетических маркерах, что позволит производителям вакцины БЦЖ и БЦЖ-М осуществлять контроль подлинности, а также мониторировать стабильность генома вакцинного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) молекулярно-биологическими методами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Леви Д.Т., Обухов Ю.И., Александрова Н.В., Волкова Р.А., Эльберт Е.В., Альварес Фигероа М.В., Прокопенко А.В., Луданный Р.И. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016, 16 (1): 49-53.

2. Abdallah A.M., Hill-Cawthorne G.A., Otto T.D. et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci. Rep.* 2015, 5: 15443 (online).
3. Bedwell J., Kairo S.K., Behr M.A., Bygraves J.A. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine.* 2001, 19: 2146-2151.
4. Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A. et al. Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays. *Infection, Genetics, Evolution*, 2014, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.024.
5. Boetzer M., Henkel C.V., Jansen H.J. et al. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics.* 2001, 4: 578-579.
6. Brosch R., Gordon S.V., Garnier T. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007, 13: 5596-5601.
7. Coll F., Mallard K., Preston M.D. et al. SpolPred: rapid and accurate prediction of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics.* 2012, 22: 2991-2993.
8. Delcher A.L., Phillippy A., Carlton J., Salzberg S.L. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.* 2002, 11: 2478-2483.
9. Knezevic I., Corbel M.J. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute, Paris, France, 7 June 2005. *Vaccine*, 2006, 24: 3874-3877.
10. Koboldt D.C., Zhang Q., Larson D.E. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012, 3: 568-576.
11. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012, 4: 357-359.
12. Leung A.S., Tran V., Wu Z. et al. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics.* 2008, 9: 413.
13. Li H., Handsaker B., Wysoker A. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009, 16: 2078-2079.
14. Magdalena J., Supply P., Loch C. Specific differentiation between Mycobacterium bovis BCG and virulent strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 9: 2471-2476.
15. Markey K., Ho M.M., Choudhury B. et al. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. *Vaccine.* 2010, 28: 6964-6969.
16. Mostowy S., Tsolaki A.G., Small P.M. et al. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine.* 2003, 21: 4270-4274.
17. Pan Y., Yang X., Duan J. et al. Whole-Genome sequences of four Mycobacterium bovis BCG vaccine strains. *J. Bacteriol.* 2011, 12: 3152-3153.
18. Pym A.S., Brosch R. Tools for the population genomics of the tubercle bacilli. *Genome Res.* 2000, 12: 1837-1839.
19. Sotnikova E.A., Shitikov E.A., Malakhova M.V. et al. Complete genome sequence of Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia). *Genome Announcements.* 2016, 4: 1-2.
20. Stefanova T. Quality control and safety assessment of BCG vaccines in the post-genomic era. *Biotechnology Biotechnological Equipment.* 2014, 28: 387-391.
21. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 12: 4498-4510.
22. WHO. Informal Consultation on Standardization and Evaluation of BCG Vaccines, 22-23 September 2009, WHO, Geneva, Switzerland. p.1-25
23. WHO. Information Sheet observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette — Guérin (BCG) vaccine. *Global Vaccine Safety, Immunization, Vaccines and Biologicals.* Geneva. April 2012. p. 1-5.
24. WHO. Report WHO Consultation on the characterisation of BCG vaccines. Geneva, Switzerland, 8-9 December, 2004. p. 1-8.

*Поступила 30.10.17*

Контактная информация: Отрашевская Елена Викторовна,  
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, п.т. (495)790-77-73

*И.В.Фельдблюм<sup>1</sup>, В.В.Романенко<sup>3</sup>, А.М.Николаева<sup>2</sup>, К.А.Субботина<sup>1</sup>,  
О.Ю.Соснина<sup>2</sup>, О.А.Перминова<sup>1</sup>, О.В.Белякова<sup>2</sup>, Т.В.Данилина<sup>2</sup>, А.Е.Ершов<sup>2</sup>,  
Д.М.Трофимов<sup>2</sup>, Е.А.Быкова<sup>2</sup>, С.В.Мартirosян<sup>3</sup>, А.В.Анкудинова<sup>4</sup>*

## **РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ АКДС-ГепВ+Ниб ПРОИЗВОД- СТВА НПО «МИКРОГЕН» ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ДЕТЕЙ 6 МЕСЯЦЕВ**

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет им. Е.А.Вагнера; <sup>2</sup>НПО «Микроген», Москва; <sup>3</sup>Детская городская больница № 10, Екатеринбург; <sup>4</sup>НИИ вирусных инфекций, Екатеринбург

*Цель.* Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности новой отечественной комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ниб. *Материалы и методы.* Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности препарата исследованы в многоцентровом простом слепом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании при иммунизации детей 6 месяцев (препарат сравнения — вакцина АКДС-ГепВ в сочетании с вакциной Хиберикс®). *Результаты.* Отечественная комбинированная вакцина АКДС-ГепВ+Ниб характеризуется хорошей переносимостью, высоким профилем безопасности и выраженной иммуногенностью. По показателям серопротекции, сероконверсии и средней геометрической титров антител сопоставима с используемыми в России вакцинами АКДС-ГепВ и Хиберикс®. *Заключение.* Вакцина АКДС-ГепВ+Ниб может быть рекомендована для регистрации на территории Российской Федерации для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и Ниб-инфекции.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 68—75

Ключевые слова: АКДС-ГепВ+Ниб вакцина, реактогенность, безопасность, иммуногенность

*I.V.Feldblyum<sup>1</sup>, V.V.Romanenko<sup>3</sup>, A.M.Nikolaeva<sup>2</sup>, K.A.Subbotina<sup>1</sup>,  
O.Yu.Sosnina<sup>2</sup>, O.A.Perminova<sup>1</sup>, O.V.Belyakova<sup>2</sup>, T.V.Danilina<sup>2</sup>, A.E.Ershov<sup>2</sup>,  
D.M.Trofimov<sup>2</sup>, E.A.Bykova<sup>2</sup>, S.V.Martirosyan<sup>3</sup>, A.V.Ankudinova<sup>4</sup>*

## **RESULTS OF A MULTICENTER CLINICAL STUDY OF A NEW COMBINATION VACCINE DTaP-HepB+Hib PRODUCTION OF THE CPA «MICROGEN» FOR IMMUNIZATION OF CHILDREN 6 MONTHS**

<sup>1</sup>Wagner Perm State Medical University; <sup>2</sup>Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; <sup>3</sup>City Children's Hospital No. 10, Ekaterinburg; <sup>4</sup>Research Institute of Viral Infections, Ekaterinburg, Russia

*Aim.* The aim of the study is evaluate of reactogenicity, safety and immunogenicity of the native combined vaccine DTaP-HepB+Hib. *Materials and methods.* Assessment of reactogenicity, safety and immunogenicity of the drug is investigated in a multicenter, comparative, randomized, simple-blind clinical trial of immunization of children 6 months (the comparator vaccine DTaP-HepB combined vaccine, Hiberix®). *Results.* The native combined vaccine DTaP-HepB+Hib is characterized by good tolerability, high safety profile and a pronounced immunogenicity. In terms of seroprotection, seroconversion and geometric mean titers of antibodies comparable to that used in Russia of vaccines DTP-HBV and Hiberix®. *Conclusion.* Vaccine DTaP-HepB+Hib can be recommended for registration in the territory of the Russian Federation<sup>4</sup> for the prevention of pertussis, diphtheria, tetanus, hepatitis B and Hib-infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 68—75

Key words: DTaP-HepB+Hib vaccine, reactogenicity, safety, immunogenicity