

## СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ И ИХ ОЦЕНКА

<sup>1</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, <sup>2</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, <sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

*Цель.* Сравнительный анализ серологических методов выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Материалы и методы.* Использованы экспериментальные диагностические наборы и тест-системы для постановки серологических методов: реакции непрямой гемагглютинации (РНГА); реакции иммунофлуоресценции (РИФ); иммуноферментного анализа (ИФА) традиционного с использованием микропланшет; ИФА после селективного концентрирования возбудителя туляремии на магноиммосорбенте (МИС); реакции микрогравиметрического анализа (МГА) на основе пьезобиосенсоров (ПБ) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Эксперименты проводили с гомологичными штаммами туляремийного микроба (тест-штаммами) и со штаммами гетерологичных микроорганизмов в модельных опытах на водопроводной воде, контаминированной различной концентрацией патогена. *Результаты.* Определены параметры каждого диагностического метода и дана оценка по показателям: чувствительности (при работе с чистыми культурами (тест-штаммами), загрязненными пробами больших объемов), специфичности, времени постановки и учета результатов, информативности, определения режимов постановки и учета. *Заключение.* Вышеперечисленные методы диагностики имеют свои достоинства и недостатки, поэтому при выборе того или иного метода исследователь должен руководствоваться своими целями. Так, для скрининговых исследований целесообразно проводить постановку ИФА, РИФ, РНГА; при выявлении возбудителя в больших объемах и загрязненных пробах эффективно применение селективного концентрирования на МИС с последующей постановкой ИФА; для выявления незначительных объемов проб и учета реакции в реальном времени возможно применение МГА и ППР.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 32—38

Ключевые слова: РНГА, РИФ, ИФА, МИС, ИГА, пьезобиосенсоры, ППР, *Francisella tularensis*, антитела

I.V.Zharnikova<sup>1</sup>, V.I.Efremenko<sup>1</sup>, T.V.Zharnikova<sup>1</sup>, S.A.Kurcheva<sup>1</sup>, S.M.Kalnoy<sup>1</sup>, D.V.Efremenko<sup>1</sup>,  
A.A.Isakova<sup>2</sup>, A.V.Indenbom<sup>2,3</sup>

## SEROLOGICAL METHODS FOR DETECTION OF THE CAUSATIVE AGENT OF TULAREMIA AND THEIR EVALUATION

<sup>1</sup>Stavropol State Institute for Plague Control; <sup>2</sup>Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Moscow; <sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Russia

*Aim.* A comparative study of serological methods for the detection of the causative agent of tularemia and their evaluation. *Materials and methods.* We used experimental diagnostic kits and test systems for the production of serological methods: indirect hemagglutination reaction (RGA); the reaction immunofluorescence (RIF); enzyme immunoassay (ELISA) using traditional microplate; IFA after selective concentration of the pathogen of tularemia in magnoimmunisorbents (MIS); microgravimetric analysis (MGA) based on piezoresistors (SP) and surface plasmon resonance (SPR). The experiments were carried out with homologous strains of tularemia microbe (test strains) and with strains of heterologous microorganisms in model experiments on tap water contaminated with different concentrations of the pathogen. *Results.* The parameters of each diagnostic method are determined and evaluated according to the following indicators: sensitivity (when working with pure cultures (test strains), contaminated samples of large volumes), specificity, time of setting and taking into account the results, informativeness, determining the modes of setting and accounting. *Conclusion.* The above diagnostic methods have their advantages and disadvantages. Therefore, when choosing a method, the researcher should be guided by the goals pursued. So, for screening studies it is advisable to carry out the

formulation of ELISA, RIF, RGA, in identifying the pathogen in large volumes and contaminated samples, the effective use of selective concentration on MIS followed by the formulation of ELISA, to identify small amounts of samples and take into account the reaction in real time, it is possible to use MGA and SPR.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 32–38

Key words: RGA, RIF, ELISA, MIS, MGA, piezoresistor, SPR, *Francisella tularensis*, antibodies

## ВВЕДЕНИЕ

Основные направления разработки диагностических препаратов предусматривают расширение возможностей индикации возбудителя за счёт появления высокочувствительных новых и усовершенствованных методов и препаратов, что способствует эффективному эпидемиологическому мониторингу инфекционных болезней. В настоящее время для индикации возбудителя туляремии применяют ряд диагностических серологических методов, в основе которых лежит высокоселективное взаимодействие «антиген-антитело»: реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА) без/с применением магноиммуносорбентов (МИС), микрогравиметрический анализ (МГА), анализ поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению новых методов исследования, однако хорошо известная РНГА до сих пор остается актуальной в диагностике инфекций. Такой метод выявления взаимодействия антиген-антитело обладает высокой чувствительностью и простотой постановки [4, 7]. Широкое распространение получили методы, основанные на применении антител, меченных маркерами — флуорохромами, которые позволяют с помощью люминесцентного микроскопа проводить высокочувствительные определения исследуемой пробы в РИФ. Этот метод достаточно прост, экономичен, может использоваться в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний, особенно в тех случаях, когда обычная бактериоскопия оказывается безрезультатной [8, 10]. Наиболее часто применяются методы с использованием антител, иммобилизованных с ферментами — ИФА, принципы и особенности которого подробно описаны в работе [2]. Увеличение чувствительности анализа и выявляемости возбудителя возможно при предварительном селективном концентрировании патогенов на МИС с последующей постановкой диагностических реакций [5, 6]. Перспективным методом детекции возбудителей является МГА с применением пьезобиосенсорных (ПБ) устройств, позволяющих быстро реализовать процесс достоверного распознавания анализируемых молекул в образовавшемся комплексе антиген-антитело. При создании ПБ используются пьезокварцевые резонаторы (ПКР), работающие не только в вакууме и на воздухе (статический режим), но и в жидкости (проточно-инжекционный режим) [1, 3]. Они характеризуются простотой в эксплуатации, а также наличием автоматической системы сбора информации [9]. Одним из эффективных способов выявления антигенов в режиме реального времени является метод ППР в проточных ячейках. Он позволяет с высокой чувствительностью количественно определять поверхностную концентрацию антител и наличие антигенов, вступающих в реакцию с находящимися на поверхности молекулами-мишенями [Isakova A. et al., 2018].

Цель работы — сравнительный анализ и оценка серологических методов выявления возбудителя туляремии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческие и экспериментальные диагностические препараты производства Ставропольского противочумного института: «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый

жидкий»; «Иммуноглобулины флуоресцирующие туляремийные сухие»; «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе»; «Набор реагентов тест-система иммуноферментная магнимоносорбентная для выявления возбудителя туляремии»; «Тест-система микрогравиметрическая биосенсорная для выявления возбудителя туляремии». Для постановки ППР применяли экспериментальные серии биосенсоров (Институт физической химии и электрохимии).

Исследования проводили на культурах гомологичных *Francisella tularensis* Miura, *F. tularensis* 890 Аз, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенных на желточной среде Мак-Коя в течение 24 ч при 37°C, инактивированных хлороформом (для всех методов, кроме РИФ) и гетерологичных штаммов *Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-М, *B. suis* 1330, выращенных на печёночном агаре в течение 48 ч при 37°C, *Yersinia enterocolitica* 178, 383 — на агаре Хоттингера в течение 48 ч при 37°C и инактивированных формалином (для всех методов, кроме РИФ). Штаммы получали из лаборатории коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института.

Эксперименты проводили с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* (тест-штаммами), штаммами гетерологичных микроорганизмов и в модельных опытах на 3 л водопроводной воды с 200 г садовой земли, контаминированной различными концентрациями *F. tularensis*. Индикацию возбудителя осуществляли методами РНГА, РИФ, ИФА, ИФА с МИС, МГА, ППР.

РНГА проводили традиционным макро- и микрометодом в лунках планшета полистиролового круглодонного с визуальным учетом результатов. РИФ ставили на фиксированных мазках гомологичных *F. tularensis* и гетерологичных штаммов. Учет результатов осуществляли по 4-крестовой системе на люминесцентном микроскопе Primo Star iLED («Carl Zeiss», Германия). За положительный результат принимали специфическое свечение не менее трех микробных клеток возбудителя туляремии с яркостью 3-4 креста.

Постановка ИФА включала сенсбилизацию планшет туляремийными иммуноглобулинами, проведение анализа и учет результатов. Проведение ИФА с МИС осуществляли путем селективного концентрирования возбудителя туляремии на МИС (магнитная матрица с иммобилизованными туляремийными антителами) с последующим взаимодействием с иммунопероксидазным туляремийным конъюгатом, отмывкой от несвязавшихся компонентов, введением хромогенной смеси. Учет результатов в традиционном ИФА (на планшетах) и ИФА с МИС проводили на фотометре Multiscan FC (ЗАО «Термо Фишер Сайентифик», США) при длине волны 450 нм с соблюдением следующих условий: среднее значение ОП отрицательного контроля не более 0,2; значение ОП в лунке с положительным контролем в 2 и более раз превышала ОП отрицательного контроля.

Постановка МГА включала: иммобилизацию туляремийных антител на золотой подложке ПКР, взаимодействие с антигеном с использованием жидкостной ячейки и перистальтического насоса (P-1 FPLC LKB Pharmacia), учет результатов по сдвигу частот на устройстве для измерения параметров и настройки пьезоэлектрических резонаторов CPNA-330 (НПФ ЗАО «ЭТНА», Россия) с программным обеспечением.

ППР проводили путем иммобилизации туляремийных антител на позолоченном стеклянном чипе, дальнейшем взаимодействии с антигеном с использованием перистальтического насоса (BT100-1F, LONGER Precision Pump) и учетом результатов на ППР-спектрометре Biosuplar 6 («Mivitec», Германия) по сдвигу резонансной кривой ППР, который пропорционален количеству частиц антигена, взаимодействующих с антителами.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли, определяя критерий Стьюдента, с использованием программы Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Один из широко и давно применяемых методов иммуноанализа — РНГА. В состав набора входит основной компонент — диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий 5 % и все необходимые ингредиенты для постановки реакции. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* были получены положительные результаты в РНГА при наличии в пробе  $5 \times 10^5$  —  $1 \times 10^6$  м.к./мл ( $t=1$ ) и выше. При контроле специфичности с гетерологичными штаммами гемагглютинация отсутствовала. Для постановки 200 анализов (макрометодом) или 2000 анализов (микрометодом) в РНГА достаточно 5 мл 5 % взвеси эритроцитарного диагностикума. Достоинства метода: высокая специфичность и чувствительность; простота постановки; требуется минимальное количество компонентов; низкая стоимость набора; визуальный учет (нет необходимости в дорогостоящем оборудовании и ингредиентах); экспрессность при исследовании микрометодом (2-2,5 ч).

Широкое распространение получил и метод флуоресцирующих антител. РИФ ставили с применением иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремиальных. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* были получены положительные результаты в РИФ при наличии в пробе  $5 \times 10^5$  —  $1 \times 10^6$  м.к./мл ( $t=0,78$ ) и выше. При контроле специфичности отсутствовало свечение с гетерологичными штаммами. Одной ампулы с препаратом в объеме 0,5 мл с активностью в РИФ 1:32 достаточно для проведения 400 анализов в дубликate. Достоинства метода: высокая специфичность и чувствительность; простота постановки; возможность обнаруживать антиген в люминесцентном микроскопе по интенсивности свечения и морфологии; экспрессность. Основным недостатком РИФ является ее субъективность.

Одним из наиболее эффективных и часто используемых методов лабораторной диагностики является ИФА. Основной компонент тест-системы — иммуноферментный конъюгат туляремиальный иммуноглобулиновый сухой. Чувствительность метода с тест-штаммами составила  $5 \times 10^5$  —  $1 \times 10^6$  м.к./мл ( $t=0,72$ ) при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами. Одной ампулы с иммунопероксидазным конъюгатом с активностью 1:400 достаточно для проведения 200 анализов в дубликate. Достоинствами метода является его экспрессность при условии использования заранее сенсibilизированных планшет; возможность одновременного исследования большого количества проб; высокая специфичность и чувствительность. К недостаткам можно отнести необходимость применения только химически чистой посуды для исключения ложноположительных результатов, а также длительность анализа при необходимости предварительной сенсibilизации планшет (16-18 ч при температуре 4-6 °С или 3 ч при температуре 36 °С).

Исследования водопроводной воды с контаминированными взвесями *F. tularensis* в РНГА, РИФ и ИФА дали отрицательные результаты, так как выявляемая концентрация возбудителя была ниже порога чувствительности анализов.

Известно, что выявить патогены в водных объектах сложно, так как их концентрация может быть существенно ниже пороговой чувствительности методов специфической индикации. Для обеспечения концентрирования *F. tularensis* из проб воды большого объема использованы туляремиальные МИС с последующим выявлением возбудителя в ИФА. МИС с иммобилизованными антителами селективно сорбируют возбудитель туляремии, а окончательная его идентификация возможна как в полевых, так и в стационарных лабораториях. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* и в модельных опытах были положительные результаты при наличии в объеме пробы  $1 \times 10^2$  —  $1 \times 10^3$  м.к. ( $t=1$ ) и выше. Достоинства ИФА с МИС: экспрессность (отсутствие этапа сенсibilизации планшет); высокая

чувствительность и возможность выявления возбудителя в загрязненных объектах окружающей среды за счет селективного концентрирования патогена.

Были сконструированы экспериментальные серии пьезоэлектрических биосенсоров для обнаружения возбудителя туляремии в МГА. В состав тест-системы входят ПБ (ПКР с золотыми электродами, активирован и иммобилизован туляремиными иммуноглобулинами) и все необходимые реагенты для постановки МГА. При проведении экспериментов, возбудитель специфически связывался с иммобилизованными на поверхности пластины ПБ иммуноглобулинами с образованием иммунокомплексов. Далее измеряли частоту колебаний и результат оценивали по сдвигу частот в Гц (разности частотных характеристик) ПБ до и после его взаимодействия с возбудителем туляремии. Положительным считали сдвиг частот в сторону уменьшения на 20 Гц и более. В качестве отрицательного контроля использовали ПБ в разводящей жидкости, не содержащей антиген. В результате установлено, что чувствительность метода составила  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  м.к./мл ( $t=0,62$ ). При постановке МГА с гетерологичными штаммами получены отрицательные результаты (сдвиг частот уменьшился на 3-5 Гц), что свидетельствует о специфичности препарата. При проведении анализа с контаминированными пробами в модельных опытах получены также отрицательные результаты в связи с загрязнением проб (присутствием в исследуемой взвеси частиц садовой земли), что мешало корректному проведению анализа. Достоинства метода: высокая чувствительность при отсутствии реакции с гетерологичными штаммами; быстрота постановки и получения результатов анализа — 15 мин; информативность — графические и табличные данные. ПБ позволяют осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий рецепторных молекул без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных и др.), что выгодно отличает их от аналогичных устройств. Недостатками являются отсутствие возможности исследовать одновременно несколько проб, в результате необходимо затрачивать время на подготовку жидкостной ячейки для следующей пробы, а также дороговизна ПБ, так как он состоит из ПКР с золотыми электродами.

Метод ППР в проточных ячейках позволяет с высокой чувствительностью регистрировать реакцию антиген-антитело в режиме реального времени. В процессе осаждения антигена на поверхности ППР-сенсора происходит взаимодействие с антителами и меняются оптические свойства приповерхностного слоя. Таким образом, измеряя величину сдвига минимума кривой ППР, можно определять поверхностную концентрацию антител и наличие в растворах возбудителя, вступающего в реакцию с находящимися на поверхности молекулами-мишенями. Постановку и учет результатов проводили с помощью ППР-спектрометра, оснащенного плоской двухкамерной проточной ячейкой. Исследуемые растворы прокачивали через обе камеры измерительной ячейки с помощью перистальтического насоса со скоростью 960 мкл/мин. Адсорбция возбудителя на поверхности чипа сопровождалась изменением оптических параметров поверхностного слоя жидкости, что приводило к росту сигнала ППР-спектрометра, измеряемого в условных единицах. Установлено, что чувствительность метода составила  $1 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$  м.к./мл ( $t=0,78$ ), что в 1000 раз превышает чувствительность методов РНГА, РИФ и ИФА при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами. При постановке ППР в модельных опытах получены отрицательные результаты в связи с загрязнением проб, что мешало корректному проведению анализа. Достоинство метода: высокая чувствительность при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами; быстрота постановки и получения результатов анализов; информативность.

Основные сравнительные характеристики методов, применяемых для индикации возбудителя туляремии, представлены в табл.

Таким образом, после проведения сравнения серологических методов диагностики можно заключить, что каждый из них имеет как достоинства, так и недостатки.

## Сравнение основных показателей серологических методов при выявлении *F. tularensis*

Метод	Время получения результата, час	Чувствительность		Специфичность	Режим постановки и учета результата измерений	Информативность
		Исследуемые объекты				
		Чистая культура	Загрязнённые объекты окружающей среды**			
РНГА	24 макро / 2 микро	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t=1)	Отсутствует гемагглютинация	Отсутствует гемагглютинация	Статический (последняя операция)	Визуально без инструментального учета
РИФ	1-1,5	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t= 0,78)	Отсутствует специфическое свечение	Отсутствует специфическое свечение		Визуально с учетом на люминесцентном микроскопе
ИФА с МИС	1	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ м.к./мл (t=1)	$(1 \times 10^2 - 1 \times 10^3)$ м.к. в пробе (t=1)	Отрицательный результат		Инструментально на фотометре
ИФА	3 (21/6)*	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t=0,72)	Отрицательный результат	Отрицательный результат		Инструментально на фотометре
МГА	0,5	$1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$ м.к./мл (t=0,62)	Отрицательный результат	Отрицательный результат	Режим реального времени с контролем каждой операции в исследовании	Инструментально на биосенсорной установке — частотомере
ППР	<0,1	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ м.к./мл (t=0,78)	Отрицательный результат	Отрицательный результат		Инструментально на ППР-спектрометре

Примечание. \* С учетом сенсибилизации планшет в холодильнике при температуре 4-6°C/ в термостате при температуре (37±2)°C; \*\* модельный опыт с загрязненными пробами.

Например, в полевых условиях или в районах, в которых отсутствует дорогостоящее оборудование, проведение диагностики туляремии возможно с использованием высокочувствительного метода РНГА без применения инструментального учета результатов реакции. Не менее чувствительными, но требующими соответствующего оборудования являются РИФ и ИФА. Более чувствительные инструментальные методы — МГА и ППР, но их не рентабельно использовать при скрининговых исследованиях из-за их дороговизны. Для выявления возбудителя туляремии в водоёмах с низкой концентрацией возбудителя, в т.ч. загрязненных, эффективным является метод ИФА с МИС, т.е. выявление возбудителя в ИФА после его селективного концентрирования на магнитной матрице.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики. Российский химический журнал, 2008, 3 (2): 17-29.
2. Долгов В.В. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине. Учебное пособие: Изд-во «Триада», 2015: 34-38.
3. Кальной С.М., Жарникова И.В., Дикова С.П., Ляпустина Л.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Жарникова Т.В., Куличенко А.Н. Заявка № 2012114858/10, 13.04.2012. Способ получения микрогравиметрического иммуносенсора. Патент РФ № 2510830, 10.04.2014. Бюл. № 10.
4. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение, 2015, 4: 21-26.

5. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л., Курчева С.А., Жарникова И.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Кальной С.М. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний. *Технологии живых систем*. 2017, 2: 52-58.
6. Тюменцева И.С., Курчева С.А., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Старцева О.Е., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы. *Военно-медицинский журнал*. 2018, 339 (5): 42-46.
7. Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., Яникова Э.А. Заявка № 2012101543/10, 17.01.2012. Способ получения эритроцитарного антигенового овисного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью индикации овисного антигена в биоматериале. Патент РФ № 2509306, 10.03.2014. *Бюл. № 7*.
8. Gall D., Nielsen K., Forbes L. et al. Alidation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.* 2000, 36 (3): 76-469.
9. Pohanka M., Skladal B. Piezoelectric Immunosensor for the Direct and Rapid Detection of *Francisella tularensis*. *Folia Microbiol.* 2007, 52 (4): 325-330.
10. Sting R., Ortmann G. Erfahrungen mit einfachen ELISA-Testsystemes für die Brucellose — Serologie bei Rind, Schaf und Ziege. *Berlin. Und munch. Wochenschr* 2000, 113 (1): 22-28.

*Поступила 27.11.18*

Контактная информация: Жарникова Ирина Викторовна,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Г.М.Игнатьев<sup>1,2</sup>, Е.В.Отрашевская<sup>1</sup>, Л.Л.Суханова<sup>1</sup>, Е.С.Сидоренко<sup>1</sup>, Н.А.Нетесова<sup>3</sup>*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММА RA-27/3, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КРАСНУХИ**

<sup>1</sup>НПО «Микроген», Москва; <sup>2</sup>Федеральный НЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва; <sup>3</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область

*Цель.* Целью данной работы было изучение генетической стабильности производственного штамма RA-27/3 вируса краснухи, используемого для производства вакцины НПО «Микроген». *Материалы и методы.* В исследовании были использованы серии производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи НПО «Микроген», готовые серии вакцин краснухи различных производителей и штамм «Орлов» вируса краснухи. Молекулярно-генетическое исследование штаммов проведено с использованием ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и секвенированием. *Результаты.* Получены полногеномные последовательности производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи, используемого НПО «Микроген» для производства вакцины. Последовательность вакцинного штамма представлена в GenBank. Показано полное соответствие штамма RA-27/3, используемого НПО «Микроген», аналогичному штамму, используемому GSK и Merck&Co. Inc. Штамм RA-27/3 вируса краснухи, применяемый НПО «Микроген», генетически стабилен. Полученные данные позволили продемонстрировать возможность использования метода ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией для подтверждения подлинности вакцинного штамма RA-27/3 вируса краснухи в готовых формах вакцин, как монокомпонентных так и трехкомпонентных. *Заключение.* Результаты проведенного исследования позволяют предположить возможность применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности изученных штаммов не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцин.

*Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 38—46*

Ключевые слова: вирус краснухи штамм RA-27/3, генетическая стабильность, метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов