

УДК 636.09:616.98:578.824:[57.083+615.371]:615.076

РОМАНЕНКО О.А., канд. вет. наук, e-mail: romanenko.oleg15@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ СКАЗУ ТВАРИН

В статті наведено статистично оброблені результати дослідження активності антирабічних вакцин для застосування у ветеринарній медицині із використанням методів НІН, його модифікації описаного монографії 0451 Європейської Фармакопеї та серологічного методу. Отриманні методами НІН та Європейської Фармакопеї значення імуногенної активності показують значні розбіжності. Вперше в Україні було застосовано напівкількісний серологічний метод для оцінки активності вітчизняних антирабічних вакцин, який не дозволяє в повній мірі оцінити протективні властивості препарату, але він суттєво зменшує кількість тварин та час дослідження. Крім того, тварини не зазнають болю, пов'язаного з інтрацеребральним введенням та симптомами сказу.

Ключові слова: сказ, інактивовані вакцини, контроль якості, принципи 3 R, метод НІН, серологічний метод, Європейська Фармакопея.

Необхідність оцінки імуногенних властивостей кожної серії вакцин для профілактики сказу з'явилася поруч із їх винаходом Луї Пастером. З цією метою вже понад 50 років використовуються стандартизовані методи. Існує 3 важливі моменти, пов'язанні з вибором методу для проведення контролю якості [1].

По-перше, метод повинен відображати кількісні показники, що характеризують протективні властивості препарату при профілактиці сказу у людей і тварин. Використання сприйнятливих видів є ідеальним для відтворення природних умов проведення профілактичних заходів. У випадку із вакцинами для гуманної медицини - це означає введення периферичним шляхом вуличного вірусу сказу із подальшим введенням імунобіологічного засобу відповідно до схеми застосування, що є вкрай непрактичним і тому більшість методів оснований на інфікуванні тест-тварин після їх імунізації. Згідно об'ємного методу НІН, що є найбільш розповсюдженим у світі, протективні властивості досліджуваної вакцини порівнюють із референс-вакциною після інтрацеребрального інфікування фіксованим штамом вірусу сказу двічі імунізованих мишей. В цілому, метод НІН у більшості випадків є придатним для оцінки імуногенних властивостей антирабічних інактивованих вакцин, проте згідно з міжнародними вимогами, в процесі лабораторних досліджень при створенні нового препарату для ветеринарної медицини необхідно продемонструвати, що він захищає щеплених цільових видів тварин при інфікуванні польовим ізолятом вірусу сказу. З іншої сторони, дослідження ефективності живих вакцин із атенуєваних штамів вірусу сказу, базоване на визначенні кількості вірусу у імунізуючій дозі, яка зазвичай повинна бути у 10 разів вища, ніж встановлена експериментальним шляхом, що 100-відсотково захищає цільові види тварин при контрольному зараженні вуличними ізолятами [1 - 7].

Другий важливий фактор при виборі методу контролю антирабічних вакцин, це його практичність: доступність необхідних матеріалів та обладнання, вартість та тривалість проведення, що буде відображатись у вартості самого препарату та терміну його придатності.

Наступний чинник, який необхідно враховувати при проведенні контролю якості – це стандартизованість методик, що дозволяє порівнювати результати досліджень різних вакцин, а також відтворювати їх у різних лабораторіях.

Для отримання достовірних результатів дослідні тварини повинні бути клінічно здоровими та відповідного віку. Ще одним фактором, що може вплинути на результати дослідження, є наявність багатьох ліній та порід тварин, які можуть відрізнятися імунологічною відповіддю на введення вакцини. Варіації у результатах також можуть бути пов'язані із використанням різних контрольних штамів вірусу сказу, що було мінімізовано застосуванням стандартного заражаючого вірусу – тест-штам CVS, який є дереватом оригінального пастерівського штаму [6, 8].

Метод НІН для контролю імуногенності антирабічних інактивованих вакцин, розроблений в Національних інститутах здоров'я США, є найбільш стандартизованим методом *in vivo*, що дозволяє отримати результати із високою відтворюваністю. Згідно даного методу мишей відповідного віку і ваги двічі з інтервалом у 7 діб внутрішньочеревно вакцинують різними розведеннями досліджуваної та референс-вакцини із подальшим інтрацеребральним інфікуванням тест-штамом CVS вірусу сказу у дозі 10 – 50 ЛД₅₀. З метою виключення впливу індивідуальних особливостей організму, тварин у кожній групі повинно бути не менше 10 голів. Подібний метод описаний і в Європейській Фармакопеї, основна відмінність якого полягає у однократній імунізації мишей [3 - 10].

Як не дивно, але метод із зараженням мишей, що є застарілим і має ряд недоліків, широко використовується в офіційних установах, контрольних лабораторіях та виробниками вакцин. Він є дорогим, тривалим у часі, вимагає значної кількості тварин (не менше 100 голів для дослідження 1 серії), а його результати характеризуються високою варіабельністю (до 400 %). Багато альтернативних методів було запропоновано для усунення цих недоліків, але всі вони непридатні для визначення якості вакцин, що містять ад'юванти [11].

Значним кроком у впровадженні та адаптації альтернативного методу контролю антирабічних вакцин було проведення у 2008 році міжлабораторних досліджень організованих Європейським директором з якості лікарських засобів. Метою даних досліджень була оцінка імуногенності різних інактивованих вакцин з використанням серологічного методу відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Згідно з даним методом, порівнюється відповідь імунної системи шляхом визначення титрів віруснейтралізуючих антитіл на введення досліджуваної і референтної вакцини. Даний метод є напівкількісним і не дозволяє в повній мірі оцінити вакцину, але він суттєво зменшує кількість тварин та час дослідження, крім того тварини не зазнають болю, пов'язаного з інтрацеребральним введенням та симптомами сказу у незахищених мишей, що повністю відповідає принципам 3 R (Refinement, Reduction, Replacement): заміна болючих для тварин експериментів дослідженнями, що не заподіюють страждань; зменшення кількості тварин; заміна високоорганізованих тварин низькоорганізованими або використання альтернативних методів [12 - 15].

Метою нашої роботи було впровадження принципів 3 R у систему контролю антирабічних інактивованих вакцин.

Матеріали і методи досліджень.

Вакцини, що були попередньо досліджені методами НІН та Європейської Фармакопеї:

1. «Вакцина антирабічна рідка інактивована для імунізації тварин «Рабістар», (RabiStar) виробництва ТОВ «Укрветпромспостач»:

- серія 020416 придатна до 04.2018 року;
- серія 051016 придатна до 10.2018;
- серія 071116 придатна до 11.2018 року;

2. «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів», виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», серія 015E004 придатний до 08.2017 року;

3. В якості референс-вакцини використовували Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use BPR, серія 4.5 із імуногенною активністю – 11 МО.

Тварини: миші, самки, 18-20 г; по 10 особин для досліджуваних зразків і стандарту. Перед імунізацією всі тварини пройшли карантин впродовж 3 днів.

Віруси: тест-штам CVS-11 і CVS-27 вірусу сказу.

Культура клітин: ВНК-21.

Референс-сироватка: The second International WHO Standard for Rabies Immunoglobulin із активністю 30 МО.

Визначення титру віруснейтралізуючих антитіл визначали методом Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) [16].

Результати досліджень та їх обговорення. Вакцини, що були відібрані для дослідження, попередньо проконтролювали за показником «Імуногенна активність» із використанням методів НІН та Європейської Фармакопеї (табл.1.).

Таблиця 1

Імуногенність антирабічних вакцин

	Назва препарату, виробник	Серія, термін придатності	Імуногенна активність, МО/см ³		
			Мінімальна згідно НД	НІН	Європейська Фармакопея
1	Вакцина антирабічна рідка інактивована для імунізації тварин «Рабістар», (RabiStar) виробництва ТОВ «Укрветпромпостач»	Серія 020416 придатна до 04.2018 року	Не менше 2,0	7,0	29,8
2		Серія 051016 придатна до 10.2018 року		7,1	22,6
3		Серія 071116 придатна до 11.2018 року		8,7	39,3
4	«Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів», виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»	Серія 015E004 придатний до 08.2017 року	Не менше 2,5	3,8	12,3

Серологічне дослідження включало внутрішньочеревну імунізацію груп з 10 мишей 1/5 (0,2 см³) рекомендованої дози досліджуваних вакцин розведених у стільки разів, скільки виробник зазначає мінімальну їх активність і референс-вакцини, розведеної до мінімального рівня, дозволеного Європейською Фармакопеею, тобто до 1 МО.

Кров відбирали на 14 добу після імунізації методом пункції серця або шляхом шийного кровопускання анестезованих мишей. Сироватку відокремлювали шляхом центрифугування 15 хв при 500 g і зберігали за температури мінус 20°C до постановки RFFIT.

Перед початком реакції нейтралізації сироватки розморозили і піддали термоінактивації на водяній бані протягом 30 хв за температури 56 °C. Склали детальний план (згідно з рис.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Стандарт 1:120	Стандарт 1:120	№1 1:5	№1 1:5	№3	№3	№5	№5	№7	№7	№9	№9
B	1:240	1:240	1:25	1:25								
C	1:680	1:680	1:125	1:125								
D	1:960	1:960	1:625	1:625								
E	CVS 1:5	CVS 1:5	№2	№2	№4	№4	№6	№6	№8	№8	№10	№10
F	1:25	1:25										
G	1:125	1:125										
H	1:625	1:625										

Рис. 1. План постановки реакції нейтралізації (RFFIT)

Стандарт – внесення робочого розчину стандарту антирабічного імуноглобуліну

CVS – внесення робочої суспензії вірусу сказу

№1-10 – досліджувані проби

Облік результатів реакції нейтралізації проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа, висвітлюючи об'єкт променями спектральної області збудження 410-480 нм та випромінювання 515-700 нм, при збільшенні 100×.

Облік проводили, візуально розділивши моношар клітин ВНК-21 в лунці на 10 непересічних полів, підраховуючи кількість полів з позитивним світінням та без нього.

Розрахунок титру антитіл в стандарті імуноглобуліну та досліджуваній пробі проводили за методом Spearman-Kärber та виражали в десятковому логарифмі 50% ефективної дози (lg ED₅₀):

$$\lg ED_{50} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right), \text{ де}$$

x_0 – lg зворотнього розведення, що відповідає ED₁₀₀ (найбільше розведення, у якому в усіх полях лунок не відмічається позитивне світіння)

d - lg фактора розведення (для стандарту - 2, для досліджуваної проби - 5);

r_i - кількість полів без позитивного світіння (полів, в яких вірус відсутній) у 2 лунках, що припадають на кожне розведення стандарту чи досліджуваної проби (20 полів зору);

n_i - загальна кількість полів у 2 лунках, що припадають на кожне розведення стандарту чи досліджуваної проби (20 полів зору).

Специфічну активність досліджуваної проби (Y , МО/см³) розраховували за формулою:

$$Y = 10^{A-B} \times N, \text{ де}$$

Y – специфічна активність досліджуваної проби, МО/см³;

A – lg ED₅₀ стандарту імуноглобуліну антирабічного;

B – lg ED₅₀ досліджуваної проби;

N - активність стандарту імуноглобуліну антирабічного, МО/см³ (у даному випадку – 30 МО/см³).

Визначення інфекційної активності вірусної суспензії проводили за методом Spearman - Kärber:

$$\lg \text{CCID}_{50} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right), \text{ де}$$

x_0 - lg зворотнього розведення, що відповідає CCID_{100} (найбільше розведення, у якому в усіх полях лункок відмічається позитивне світіння)

d - lg фактора розведення вірусної суспензії (в даному випадку - 5);

r_i - кількість полів, в яких відмічається позитивне світіння (тобто вірус присутній) у 2 лунках, що припадають на кожне розведення вірусної суспензії (20 полів зору);

n_i - загальна кількість полів у 2 лунках, що припадають на кожне розведення вірусної суспензії (20 полів зору).

Результати тесту вважаються достовірними, якщо інфекційна активність вірусу дорівнює від 1,5 до 2,5 lg $\text{CCID}_{50}/0,05 \text{ см}^3$.

Результати дослідження наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Ефективна доза (чисельник) і титри віруснейтралізуючих антитіл (знаменник) через 14 діб після імунізації мишей

№ тварини	Стандарт	Рабістар с. 051016	Рабістар с. 020416	Рабістар с. 071116	Антиген с. 015E004
1	1,4678/2,88	1,6426/4,31	2,1319/13,29	2,1319/13,29	2,0969/12,26
2	0,8737/0,73	2,0270/10,44	2,2717/18,33	1,0834/1,19	1,6426/4,31
3	0,8737/0,73	1,9222/8,2	0,5592/0,36	1,2931/1,93	1,1533/1,4
4	0,4893/0,3	2,2018/15,61	2,2018/15,61	1,4678/2,88	1,5727/3,67
5	≤0,3495/≤0,22	2,0969/12,26	1,2931/1,93	1,0485/1,1	1,0485/1,1
6	1,5028/3,12	1,3280/2,09	2,3066/19,87	2,1319/13,29	2,3415/21,53
7	1,5377/3,38	2,1668/14,4	2,3066/19,87	2,2018/15,61	1,1533/1,4
8	≤0,3495/≤0,22	2,0969/12,26	0,3844/0,24	0,5592/0,36	1,6775/4,67
9	1,4678/2,88	1,8872/7,56	2,3415/21,53	1,7824/5,94	1,5727/3,67
10	0,8737/0,73	1,9222/8,2	1,0135/1,01	2,3066/19,87	1,6775/4,67
Кількість антигену, МО	0,2	2,26	2,98	3,93	0,98
min титр	≤0,22	2,09	0,24	0,36	1,1
max титр	3,38	15,61	21,53	19,87	21,53
M±m	1,48±1,27	9,53±3,46	11,2±8,26	7,55±6,38	5,87±4,41
Сероконверсія, %	80	100	100	100	100
Захист, %	60	100	80	90	100
p	> 0,2	> 0,02	> 0,2	> 0,2	> 0,2

Примітка: ≤0,22 – чутливість реакції

Результати випробування вважаються дійсними, оскільки згідно з вимогами монографії 0451 Європейської Фармакопеї, не більше 2 мишей у групі, якій вводили референту вакцину, можуть не мати жодних антитіл до вірусу сказу. Але, враховуючи значні розбіжності в отриманих результатах в межах кожної групи, що добре видно із значень похибок та довірчого інтервалу, ми не змогли, використовуючи критерій Стюдента, статистично оцінити якість вакцин. Тому звернулись з проханням про допомогу до наших колег із Європейської референс-лабораторії по сказу ANSES-NANCY, Франція.

З допомогою комп'ютерної програми CombiStat у референс-лабораторії були отримані наступні результати (рис. 2, 3, 4, 5).

Аналізуючи отримані результати можна зробити висновок, що всі досліджувані вакцини витримали серологічний тест на активність (активність > 1 МО/дозу), а враховуючи їх коефіцієнт розведення перед введенням мишам, то «Вакцина антирабічна рідка інактивована для імунізації тварин «Рабістар», (RabiStar) виробництва ТОВ «Укрветпромстач» має активність більше мінімальної (2,0 МО) для серії 020416 придатна до 04.2018 року із вірогідністю $p=0.020$, серія 051016 придатна до 10.2018 року із $p=0.000$, серія 071116 придатна до 11.2018 року із $p=0.017$; «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів», виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», серія 015E004 придатний до 08.2017 року має активність не менше 2,5 МО на дозу із вірогідністю $p=0.001$.

Щиру вдячність за допомогу у проведенні досліджень автор висловлює співробітникам Європейської референс-лабораторії по сказу ANSES-NANCY, Франція та ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», Україна.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Результати дослідження імуногенної активності антирабічних інактивованих вакцин, отриманих із використанням методів НІН та Європейської Фармакопеї, не є тотожними.

2. Вперше в Україні на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів було проведено контроль якості антирабічних інактивованих вакцин для ветеринарної медицини із використанням серологічного методу.

В подальшому планується впровадження принципів 3 R у системи контролю інших препаратів.



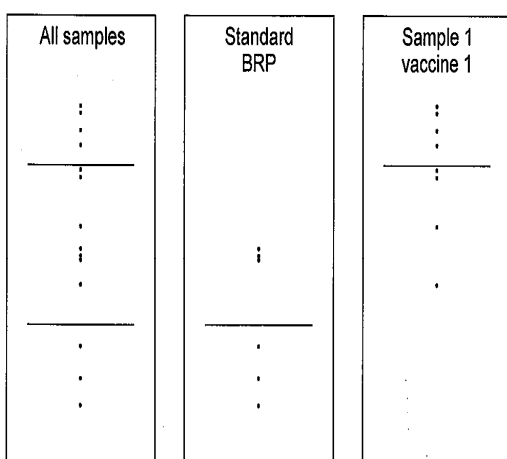
Test	Potency test of rabies inactivated vaccines (veterinary use)
Method	Serological Potency Assay
Date of vaccination	n/a
Date of blood sampling	n/a
Dates of FAVN test	n/a

data set 1 from Ukraine

Standard	
Reference Vaccine	BRP
Batch Number	N°4.5
-	-
Ass. pot.	11 IU/vial
Pre-dil. 1	1 vial/11ml
Doses	0.2ml
(1)	0.59
(2)	0.24
(3)	0.24
(4)	0.11
(5)	0.00
(6)	0.61
(7)	0.64
(8)	0.00
(9)	0.59
(10)	0.24

Sample 1	
Batch Number	vaccine 1
Sample Number	
Vaccine	
MAH	
Ass. pot.	?IU/dose
Pre-dil. 1	1 dose / 1 ml
Doses	0.2ml
(1)	0.73
(2)	1.06
(3)	0.96
(4)	1.22
(5)	1.12
(6)	0.49
(7)	1.19
(8)	1.12
(9)	0.93
(10)	0.96

Sample 1	
Batch Number	vaccine 1
Limit tested	1.00000 IU / dose
Probability	0.000 (***)



Executed by:

Calculated by: A. SERVAT

Approved by: S. SERVAT

Рис. 2. Результати серологічного тесту на активність вакцини Рабістар с. 051016



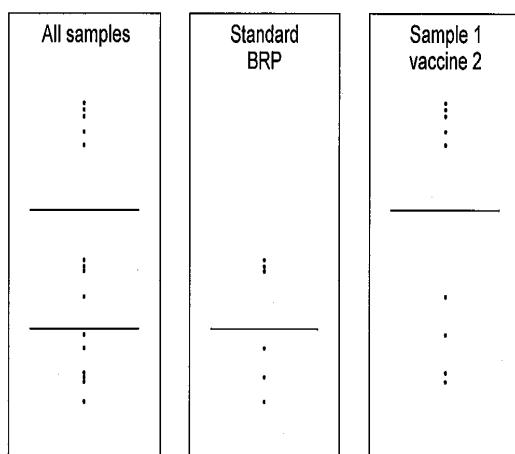
Test	Potency test of rabies inactivated vaccines (veterinary use)
Method	Serological Potency Assay
Date of vaccination	n/a
Date of blood sampling	n/a
Dates of FAVN test	n/a

data set 2 from Ukraine

Standard	
Reference Vaccine	BRP
Batch Number	N°4.5
-	-
Ass. pot.	11 IU/vial
Pre-dil. 1	1 vial/11ml
Doses	0.2ml
(1)	0.59
(2)	0.24
(3)	0.24
(4)	0.11
(5)	0.00
(6)	0.61
(7)	0.64
(8)	0.00
(9)	0.59
(10)	0.24

Sample 1	
Batch Number	vaccine 2
Sample Number	
Vaccine	
MAH	
Ass. pot.	?IU/dose
Pre-dil. 1	1 dose / 1 ml
Doses	0.2ml
(1)	1.16
(2)	1.29
(3)	0.13
(4)	1.22
(5)	0.47
(6)	1.32
(7)	1.32
(8)	0.09
(9)	1.35
(10)	0.30

Sample 1	
Batch Number	vaccine 2
Limit tested	1.00000 IU / dose
Probability	0.020 (*)



Executed by:

Calculated by: A. SERVAT

Approved by: S. SERVAT

Рис. 3. Результати серологічного тесту на активність вакцини Рабістар с. 020416



Test	Potency test of rabies inactivated vaccines (veterinary use)
Method	Serological Potency Assay
Date of vaccination	n/a
Date of blood sampling	n/a
Dates of FAVN test	n/a

data set 4 from Ukraine

Standard	
Reference Vaccine	BRP
Batch Number	N°4.5
-	-
Ass. pot.	11 IU/vial
Pre-dil. 1	1 vial/11ml
Doses	0.2ml
(1)	0.59
(2)	0.24
(3)	0.24
(4)	0.11
(5)	0.00
(6)	0.61
(7)	0.64
(8)	0.00
(9)	0.59
(10)	0.24

Sample 1	
Batch Number	vaccine 4
Sample Number	
Vaccine	
MAH	
Ass. pot.	?IU/dose
Pre-dil. 1	1 dose / 1 ml
Doses	0.2ml
(1)	1.16
(2)	0.34
(3)	0.47
(4)	0.59
(5)	0.32
(6)	1.16
(7)	1.22
(8)	0.13
(9)	0.84
(10)	1.32

Sample 1	
Batch Number	vaccine 4
Limit tested	1.00000 IU / dose
Probability	0.017 (*)

All samples
.
.
.
—
i
.
—
.
.
.

Standard BRP
.
.
.
—
i
.
.
.
.

Sample 1 vaccine 4
.
.
.
—
i
.
.
.
.

Executed by:

Calculated by: A. SERVAT

Approved by: S. SERVAT

Рис. 4. Результати серологічного тесту на активність вакцини Рабістар с. 071116



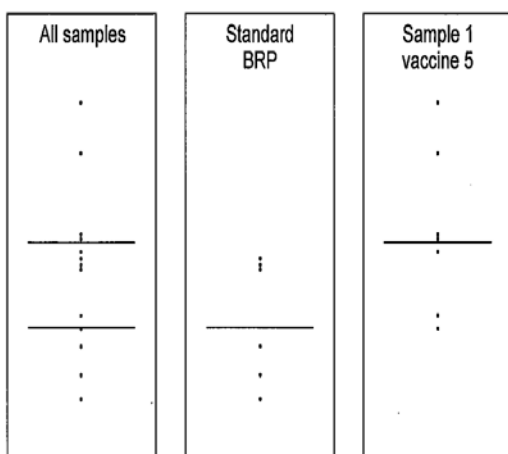
Test	Potency test of rabies inactivated vaccines (veterinary use)
Method	Serological Potency Assay
Date of vaccination	n/a
Date of blood sampling	n/a
Dates of FAVN test	n/a

data set 5 from Ukraine

Standard	
Reference Vaccine	BRP
Batch Number	N°4.5
-	-
Ass. pot.	11 IU/vial
Pre-dil. 1	1 vial/11ml
Doses	0.2ml
(1)	0.59
(2)	0.24
(3)	0.24
(4)	0.11
(5)	0.00
(6)	0.61
(7)	0.64
(8)	0.00
(9)	0.59
(10)	0.24

Sample 1	
Batch Number	vaccine 5
Sample Number	
Vaccine	
MAH	
Ass. pot.	?IU/dose
Pre-dil. 1	1 dose / 1 ml
Doses	0.2ml
(1)	1.12
(2)	0.73
(3)	0.38
(4)	0.67
(5)	0.32
(6)	1.35
(7)	0.38
(8)	0.75
(9)	0.67
(10)	0.75

Sample 1	
Batch Number	vaccine 5
Limit tested	1.00000 IU / dose
Probability	0.001 (**)



Executed by:

Calculated by: A. SERVAT

Approved by: S. SERVAT

Рис. 5. Результати серологічного тесту на активність «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів»

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Meslin F. Laboratory Techniques in Rabies / F. Meslin, M. Kaplan, H. Koprowski. 4th edition. - Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 1996. – 476 p.
2. Frana T.S. Postmarketing surveillance of rabies vaccines for dogs to evaluate safety and efficacy / T.S. Frana, N.E. Clough, D.M. Gatewood, C.E. Rupprecht // JAVMA. – 2008. – Vol. 232(7). – P. 1000-1002.
3. Code of Federal Regulations, Title 9, Chapter 1, Subchapter E, Part 113.209 [Електронний ресурс] режим доступу до ресурсу: <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/113.209>.
4. Metz B. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems / B. Metz, C.F.M. Hendriksen, W. Jiskoot, F.A. Kersten // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – P. 2411-2430.
5. Bruckner L. Reduction of the number of mice used for potency testing of human and animal rabies vaccines / L. Bruckner, M. Palatini, M. Ackermann, H.K. Muller, U. Kihm // Experientia. – 1988. – Vol.44. – P. 853-857.
6. Barth R. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine // R. Barth, G. Diderrich, E. Weinmann // Vaccine. - 1988.- Vol. 6. – P. 369-377.
7. Wunderli P.S. Effects of vaccination route and dosage on protection from rabies after intracerebral challenge in mice / P.S. Wunderli, D.W. Dreesen, T.J. Miller, G.M. Baer // AJVR. – 2003. – Vol. 64(4). – P. 491-498.
8. Wunderli P.S. Effect of heterogeneity of rabies virus strain and challenge virus route on efficacy of inactivated rabies vaccine in mice / P.S. Wunderli, D.W. Dreesen, T.J. Miller, G.M. Baer // AJVR. – 2003. – Vol. 64(4). – P. 499- 505.
9. Wunderli P.S. The rabies peripheral challenge test: more accurate determination of vaccine potency / P.S. Wunderli, D.W. Dreesen, T.J. Miller, G.M. Baer // Vaccine – 2006. – Vol. 24. – P. 7115-7123.
10. Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use, monograph 0451. Ph. Eur. 6th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; 2008.
11. Kramer B. The rapid fluorescent focus inhibition test is suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines / B. Kramer, H. Schildger, H.A. Behrendorf-Nicol, K.M. Hanschmann, K. Duchow // Biologicals. – 2009. – Vol. 37. – P. 119-126.
12. Krämer B. Milne Collaborative Study for Validation of a Serological Potency Assay for Rabies Vaccine (inactivated) for Veterinary Use / B. Krämer, L. Bruckner, A. Daas, C. Milne // Pharmeuropa Bio & Scientific Notes. – 2010. – Vol. 2. – P. 37-55.
13. Servat A. In vivo potency tests of rabies inactivated vaccines for veterinary use. A 2-year retrospective analysis of data according to the criteria of the European Pharmacopoeia / A.Servat, S. Kempff, A.Labadie, J.L. Schereffer, F. Boue, F. Cliquet // Pharmeuropa. – 2008. – Vol. 20. – P. 655–664.
14. Bruckner L. Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. / L. Bruckner, K. Cussler, M. Halder, J. Barrat, P.Castle, K. Duchow, D.M. Gatewood, R.Gibert, J. Groen, B. Knapp, R. Levis, C. Milne, S. Parker, K. Stunkel, N. Visser, P. Volkers // The report and recommendations of ECVAM workshop 48. – 2003. – ATLA. – Vol. 31. – P. 429–454.
15. Stokes W. Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward / W. Stokes, R. McFarland, J. Kulpa-Eddy, D. Gate-wood, R. Levis, M. Halder, G. Pulle, H. Kojima, W. Casey, A. Gaydamaka, T. Miller, K. Brown, C. Lewis, J.M. Chapsal, L. Bruckner, S. Gairola, E. Kamphuis, C.E. Rupprecht, P. Wunderli, L. McElhinney, F. De Mattia, K. Gamoh, R. Hill, D. Reed, V. Doelling, N. Johnson, D. Allen, L. Rinckel, B. Jones // Biologicals. – 2012. – Vol. 40. – P. 369–381.
16. Rabies. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). – 7th ed. – Paris, France: World Organisation for Animal Health (.OIE). – 2012. – P. 263–282.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИН ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ / Романенко О.А.

В статье представлены статистически обработанные результаты исследования активности антирабических вакцин для применения в ветеринарной медицине с использованием методов НИИ, его модификации описанной в монографии 0451 Европейской Фармакопеи и серологического метода. Полученные методами НИИ и Европейской Фармакопеи значения иммуногенной активности показывают значительные отличия. Впервые в Украине был применен полуколичественный серологический метод для оценки активности отечественных антирабических вакцин, который не позволяет в полной мере оценить протективные свойства препарата, но существенно уменьшает количество животных и время исследования. Кроме того, животные не подвержены боли связанной с интрацеребральным введением и симптомами бешенства.

Ключевые слова: бешенство, инактивированные вакцины, контроль качества, принципы 3 R, метод НИИ, серологический метод, Европейская Фармакопея.

SEROLOGICAL METHOD FOR QUALITY CONTROL OF VACCINE FOR ANIMALS AGAINST RABIES / Romanenko O.A.

Introduction. *The mouse challenge test still remains the reference method for the potency determination of human and animal inactivated rabies vaccines, and it is still widely used throughout the world. This tests offers from many disadvantages — it is expensive and time consuming, uses a large number of mice, causes significant animal distress, and suffers from high variability and can be problematic in terms of reaching all of the validity criteria. Recently, the European Pharmacopoeia has recognized the use of a serological potency assay (SPA) as an alternative method to the challenge test. The SPA significantly reduces the number of animals used for the batch potency testing of inactivated rabies vaccines for veterinary use. In addition, it avoids the pain and distress associated with the intracranial injection and subsequent clinical signs in unprotected animals, thereby complying with Three Rs principles.*

The goal of our work was to implement the principles of 3 R in the system of control inactivated vaccines against rabies.

Materials and methods. *Vaccines previously tested by NIH and European Pharmacopoeia methods:*

1. «RabiStar» manufactured «Ukrvetprompostach» Ltd: three batches.
2. «Antigen of a rabies virus for immunization of horse producers», manufactured PJSC «PHARMSTANDART-BIOLIK», batch number 015E004 expiry date 08.2017;
3. As reference vaccine was used Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use BPR, batch number 4.5 with immunogenic activity - 11 IU. It is a freeze-dried vaccine derived from the Pitman-Moore (PM) strain of rabies virus produced in the Nil-2 cell line and inactivated with betapropiolactone.

Animals: mice, females, 18-20 g; 10 specimens for the test vaccines and standard. Before immunization, all animals were quarantined for 3 days.

Viruses: The Challenge Virus Standard-11 strain (CVS-11) is a standard, fixed laboratory strain (ATCC® Reference VR-959), produced in BHK-21 cells and stored at -80°C. It was used to infect BHK-21 cells used in the RFFIT. The Challenge Virus Standard-27 strain (CVS-27) is a standard, fixed laboratory strain (ATCC® Reference VR-321), produced in live mice and stored lyophilized. It was used to infect mice in the mouse challenge test.

Cell Culture: BHK-21.

Reference serum: The second International WHO Standard for Rabies Immunoglobulin with activity of 30 IU.

The serological assay used involves the immunization of groups of 10 mice with approximately 1/5th the recommended dose volume of the test vaccine diluted appropriately, or of the reference standard vaccine preparation which is adjusted to the minimum potency allowed in the Ph. Eur. 14 days after immunization blood samples are taken and the sera are tested individually for rabies antibody using the described virus

neutralization assay. Briefly, sera are titrated on 96-well microtitre plates and incubated for 1h with rabies virus. After adding BHK cells and incubating for 48h the presence of unneutralized rabies virus is revealed by immunofluorescence. Dilutions of the sera that reduce the number of fluorescent cells by 50 per cent are calculated.

Results of research and discussion. All tested vaccines have satisfactory results in serological potency assay (activity > 1 IU / dose), and given their dilution factor before injection to mice, «RabiStar» manufactured «Ukrvetprompostach» Ltd has an activity greater than the minimum (2.0 IU) for the batch number 020416 expiry date 04.2018 with the probability $p = 0.020$; batch number 051016 expiry date 10.2018 with $p = 0.000$; batch number 071116 expiry date 11.2018 with $p = 0.017$; "Antigen of a rabies virus for the immunization of horse producers", manufactured by PJSC "PHARMSTANDART-BIOLIK", batch number 015E004 expiry date 08.2017, has an activity of not less than 2.5 IU per dose with a probability of $p = 0.001$.

The author expresses his sincere gratitude for the help in carrying out the research to the colleagues from the European reference laboratory for rabies ANSES-NANCY, France and PJSC "PHARMSTANDART-BIOLIK", Ukraine.

Conclusion and prospect for further research. The results of immunogenic activity inactivated vaccines against rabies obtained using the NIH and European Pharmacopoeia methods are not identical. The first time in Ukraine in the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms was using the serological potency assay for quality control of inactivated vaccines against rabies. In the future it is planned to implement the principles of 3 R in the control system of other vaccines.

Keywords: rabies, inactivated vaccines, quality control, 3 R principles, NIH method, serological potency assay, European Pharmacopoeia.

REFERENCES

1. Meslin, F., Kaplan, M., Koprowski, H. (1996). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th edition. Geneva, Switzerland: World Health Organisation [in English].
2. Frana, T.S., Clough, N.E., Gatewood, D.M. & Rupprecht, C.E (2008). Postmarketing surveillance of rabies vaccines for dogs to evaluate safety and efficacy. *JAVMA*, 232(7), 1000-1002 [in English].
3. Code of Federal Regulations, Title 9, Chapter 1, Subchapter E, Part 113.209. Retrieved from <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/113.209> [in English].
4. Metz, B., Hendriksen, C.F.M., Jiskoot, W. & Kersten, F.A. (2002). Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine*, 20, 2411-2430 [in English].
5. Bruckner, L., Palatini, M., Ackermann, M., Muller, H.K. & Kihm, U. (1988). Reduction of the number of mice used for potency testing of human and animal rabies vaccines. *Experientia*, 44, 853-857 [in English].
6. Barth, R., Diderrich, G. & Weinmann, E. (1988). NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine*, 6, 369-377 [in English].
7. Wunderli, P.S., Dreesen, D.W., Miller, T.J., Baer, G.M. (2003). Effects of vaccination route and dosage on protection from rabies after intracerebral challenge in mice. *AJVR*, 64(4), 491-498 [in English].
8. Wunderli, P.S., Dreesen, D.W., Miller, T.J., Baer, G.M. (2003). Effect of heterogeneity of rabies virus strain and challenge virus route on efficacy of inactivated rabies vaccine in mice. *AJVR*, 64(4), 499- 505 [in English].
9. Wunderli, P.S., Dreesen, D.W., Miller, T.J., Baer, G.M. (2006). The rabies peripheral challenge test: more accurate determination of vaccine potency. *Vaccine*, 24, 7115-7123 [in English].
10. Anon. (2008). Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use, monograph 0451. Ph. Eur. 6th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe [in English].
11. Kramer, B., Schildger, H., Behrendorf-Nicol, H.A., Hanschmann, K.M., Duchow, K. (2009). The rapid fluorescent focus inhibition test is suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals*, 37, 119-126 [in English].

12. Krämer, B., Bruckner, L., Daas, A., Milne, C. (2010). Collaborative Study for Validation of a Serological Potency Assay for Rabies Vaccine (inactivated) for Veterinary Use. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*, 2, 37-55 [in English]

13. Servat, A., Kempff, S., Labadie, A., Schereffer, J.L., Boue, F., Cliquet, F. (2008). In vivo potency tests of rabies inactivated vaccines for veterinary use. A 2-year retrospective analysis of data according to the criteria of the European Pharmacopoeia. *Pharmeuropa*, 20, 655–664 [in English].

14. Bruckner, L., Cussler, K., Halder, M., Barrat, J., Castle, P., Duchow, et al. (2003). Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. *The report and recommendations of ECVAM workshop 48. ATLA*, 31, 429–454 [in English].

15. Stokes, W., McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Gate-wood, D., Levis, R., Halder, et al. (2012). Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. *Biologicals*, 40, 369–381 [in English].

16. OIE (2012). Rabies. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*, 7th edn, pp. 263–282. Paris, France: World Organisation for Animal Health [in English].

УДК:619:616.981.51:615.373/.383:636.1

РУБЛЕНКО І.О., канд. вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

rubs@ukr.net

СКРИПНИК В.Г., д-р. вет. наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ПІНЧУК Н.Г., канд.вет.наук, e-mail: pinchuk.2578@gmail.com

ПУСТОВІТ Н.А., аспірант, e-mail: nadiapustovit@gmail.com

РУБЛЕНКО Н.М., аспірант.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ВИЗНАЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАКЦИННОГО ШТАМУ *Bacillus anthracis* UA-07 У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

У статті наведені результати визначення стабільності біологічних властивостей вакцинного штаму *Bacillus anthracis* UA-07. При проведенні 20 пасажів на бульйоні Хоттінгера виявлено стабільність культуральних властивостей досліджуваного штаму. При багаторазових пересівах на поживні щільні та рідкі середовища ріст сталий, відповідав росту збудника; багаторазове пасажування через організм лабораторних тварин (мурчаків, мишей) не викликало зміни морфологічних, культуральних властивостей; вакцинний штам *Bacillus anthracis* UA-07 володіє стабільними біологічними властивостями і може бути використаний у подальших дослідженнях для створення вакцини.

Ключові слова: сибірка, стабільність, *Bacillus anthracis*, миші, мурчаки.

Постановка проблеми. У світі, серед тварин та людей, існує проблема інфекційного захворювання сибіркою [1–2]. Постійні повідомлення про захворювання на сибірку у різних країнах надає ВООЗ [3]. Вивченням випадків захворювання, епідеміології, профілактики, лікування та їх удосконаленням займається велика кількість вчених, науковців [4–10]. Одним