

УДК 619:616-036.22:578.824.11

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗРАБОТКИ И ВНЕДРЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН ИЗ ШТ. ЩЕЛКОВО-51

Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И., Еремец Н.К., Иванов И.В., Салов Д.А., Лихашерстова С.В.
ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» РАСХН, Щелково, Московская обл.

Красуткин С.Н.
ФГУП «Щелковский биокомбинат»

Бешенство – острое зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, которое представляет большую опасность во всем мире, и по оценке ВОЗ по наносимому социальному и экономическому ущербу среди инфекционных болезней занимает 5 место. Ущерб от заболеваемости бешенством животных и людей определяется затратами на медицинскую и ветеринарную помощь, потерями от падежа и убоя с/х животных, расходами на борьбу с безнадзорными животными и регуляцию численности диких животных [1]. Напряженность эпизоотической ситуации по бешенству в ряде стран продолжает оставаться высокой, территория России также стабильно неблагополучна по бешенству [2].

Одним из основных и эффективных способов предотвращения бешенства признана своевременная и эффективная иммунопрофилактика антирабическими вакцинами. К примеру, опыт борьбы с бешенством в странах западной Европы (Англия, Германия, Швеция и др.) показал, что вакцинация 80 % популяции домашних животных и бродячих собак и кошек приводит к полному прекращению случаев заболевания людей.

С момента создания Л. Пастером первой антирабической вакцины прошло почти 125 лет. Созданная им мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков, главные из которых: наличие в составе мозговой «балластной» ткани и жизнеспособного вируса, многократность инокуляций вакцины. Это вынуждало исследователей искать новые пути совершенствования препарата. До 1948 г. вакцины готовили из мозга взрослых животных (кролики, овцы, козы), инфицированных фиксированным вирусом бешенства. Это вакцины типов Ферми (1907), Семпла (1911), Умедо Дои (1916), в которых вирус бешенства частично инактивирован и вакцины типов Хемпт (1925) и Келсер (1925), в которых вирус полностью инактивирован эфиром, фенолом или хлороформом.

Накопленный опыт показал, что иммунологическая эффективность вакцин зависела от системы культивирования вируса, выбора штамма и глубины его аттенуации для живых вакцин; антигенной активности, накопления вируса при культивировании, конечного соотношения количества вирусного антигена и сопутствующих балластных тканей для инактивированных вакцин.

Первым шагом снижения содержания энцефалитогенных субстанций было изготовление вакцин из нервной ткани новорожденных мышей с использованием центрифугирования (17000 об/мин.). Следующим шагом – получение высокоочищенной вакцины из утиных эмбрионов с инактивированием фиксированного вируса. Но наиболее крупным достижением стала разработка методов изготовления вакцин на культурах клеток: первичные клетки почек хомяков, собак, линии диплоидных клеток человека, обезьян-резусов и перевиваемые клетки Vero. Параллельно было селекционировано множество вакцинных штаммов вируса (табл.1).

Таблица 1 – Штаммы вируса бешенства, используемые для производства антирабических вакцин

№	Наименование штамма	Происхождение штамма
1	Пастера	Парижский, первый вакцинный.шт
2	Москва	шт. «Пастера»
3	PV-11 или PM	шт. «Пастера»
4	Овечий-ВГНКИ	шт.«Москва»
5	Щелково-51	шт. «Овечий-ВГНКИ»
6	БелНИИЭВ-ВГНКИ (РБ-71)	шт. «Овечий-ВГНКИ»
7	0-73 Уз-ВГНКИ,	шт. «Овечий-ВГНКИ»
8	Краснопресненский-85	шт. «Овечий-ВГНКИ»
9	ВИРАБ-2001	шт. «БелНИИЭВ-ВГНКИ» (РБ-71)
10	CVS	Стандартный, из шт.Пастера
11	Flury LEP, Flury HEP	США, выд. от человека, высоко патогенен
12	KeLev	Выделен из мозга собаки
13	SAD, SAD-Bern, SAD-B19	Выделен из мозга собаки
14	SAG1 и SAG2	Мутанты SAD
15	ERA	шт. SAD
16	Внуково-32	шт. SAD
17	V-319	Мексика, выд. из слюнной железы вампира
18	TC-80	Клонирован от шт. V-319

Новые знания определили дальнейшие подходы к созданию вакцин и диагностических препаратов. Появилось 84 разновидности вакцины, из них: 30 типов – живые и аттенуированные и 54 – инактивированные [3]. Авторы стремились с одной сто-

роны повысить их иммуногенные свойства путем выделения и отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцин при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации вируса (табл. 2).

Таблица 2 – Первые этапы создания вакцин против бешенства животных и человека

<i>Тип вакцины</i>	<i>Субстрат для размножения вакцинного вируса</i>	<i>Годы создания</i>
Частично инактивированная	Мозговая ткань взрослых животных (кролики, овцы, козы)	1885-1908
Инактивированная	Мозговая ткань взрослых животных (кролики, овцы, козы)	1911-1925
Инактивированная	Мозговая ткань новорожденных животных (крольчата, мышата, крысята)	1955-1965
Живая, аттенуированная	Эмбриональные ткани птиц (куры, утки)	1948-1953
Инактивированная	Эмбриональные ткани птиц (куры, утки)	1956
Инактивированная	Культуры клеток почки сирийского хомяка	1960-1967
Живая, аттенуированная	Культуры клеток почки поросенка	1964
Инактивированные	Культуры диплоидных клеток эмбрионов человека	1964-1971
Живая, аттенуированная	Культуры клеток почки сирийского хомяка	1973
Инактивированная	Культура клеток почки эмбрионов КРС	1974

К 1990 году практически во всех развитых странах прекратился выпуск и применение тканево-мозговых вакцин. Более 90 % стран-импортеров отдали предпочтение клеточно-культуральным инактивированным препаратам.

Настоящим прорывом в вакцинологии можно считать использование для репликации вируса бешенства перевиваемых клеток животных. Впервые в мире во ВНИТИБП была доказана возможность использования перевиваемой линии клеток ВНК-21 для промышленного получения вируса бешенства, пригодного без концентрирования получать безвредные высокоиммуногенные вакцины. Для этих целей в результате целенаправленной селекционной работы был получен новый производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Щелково-51», адаптированный к культуре клеток ВНК-21 и обладающий высокой иммуногенной потенцией и стабильностью (Патент РФ № 890591, 1993 г.). Были заложены производственные криобанки вируса и клеток, которые сохранили функциональность до настоящего времени. Апробированы разные способы инактивации вируса, в результате которых был выбран совершенно безвредный для организма животных β-пропиолактон, легко гидролизующийся в водных растворах и имеющий короткий период полураспада. Разработано оборудование для выращивания клеток и вируса в роллерах. В итоге была получена первая в мире инактивированная культуральная антирабическая вакцина, которая по иммуногенной активности соответствовала международным стандартам. Вакцина была внедрена на предприятиях биологической промышленности: на Щелковском биокombинате за 1981-1984 г.г. изготовлено около 5,5 млн. доз, на Грузинском биокombинате в 1984 г. – более 600 тыс. доз, в 1985 г. – 2 млн. доз. В 90-х годах вакцина была усовершенствована и на ее основе созданы два новых препарата: сухая «Рабикан» для кошек и собак и жидкая «Рабиков» для крупного и мелкого рогатого скота. В 1990 г. объем производства достиг 10 млн. доз в год. Это полностью обеспечивало потребности ветеринарии страны (табл. 3).

Таблица 3 – Антирабические вакцины из вируса шт. «Щелково-51», репродуцированного в культуре клеток ВНК-21, разработанные во ВНИТИБП

<i>Фирменное название</i>	<i>Состав, технология, активность, применение</i>	<i>Срок хранения</i>	<i>Годы разработки, НТД, патенты</i>
Рабиков	Жидкая ГОА – вакцина, роллерная, им.активность ≥1,0 МЕ/мл, для крупного, мелкого рогатого скота и лошадей	12 мес.	1972-1980 гг. ТУ 9384-023-00482915-01
СКИАВ + РКAB	Сухая вакцина + растворитель, для крупного и мелкого рогатого скота	12 мес.	ТУ9384-025-00482915-01 ТУ9384-028-00482915-01
Рабикан	Сухая вакцина для кошек и собак	12 мес.	1972-1980 гг. ТУ9384-024-00482915-01
Рабавак	Сухая адьювант- вакцина с сапонином, на микроносителях в биореакторах, 1,4-1,55 МЕ/мл, для крупного и мелкого рогатого скота	14 мес.	2001-2005 гг. ТУ 9384-035-0048915-03
УНИРЭВ	Жидкая этанол -вакцина, на микроносителях в биореакторах, ≥2,0 МЕ/мл, для крупного, мелкого рогатого скота, собак и др. видов животных	24 мес.	2006-2010 гг.

По своим качественным характеристикам все вакцины полностью соответствовали международным требованиям к антирабическим препаратам. Со времени полевых испытаний, периода внедрения и массового применения не было зарегистрировано ни одного случая осложнения после вакцинации или заболевания привитых животных даже в неблагополучных по бешенству районах.

Однако в последние годы в биотехнологии получили признание более производительные и экономичные методы репродукции вирусов в суспензии и псевдосуспензии (на микроносителях). Испытанный вначале суспензионный метод культивирования клеток и вируса, не дал высоких результатов по иммуногенности, а репликация вируса в тех же клетках, но выращенных на микроносителях, способствовала высокому накоплению высокоактивного вируссодержащего материала. Производительность

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

реакторного способа возростала более чем в 2 раза, при этом качество вакцины не уступало самым высоким международным требованиям. Таким образом, была разработана современная технология производства сухой культуральной адьювант-вакцины Рававак (Патент РФ № 2191600, 2001), производство которой в 2006 г. было освоено на Щелковском биокOMBинате.

В 2007 г. перед нами была поставлена задача – увеличить срок годности отечественных вакцин, чтобы они по стабильности и иммуногенной активности были конкурентоспособны лучшим импортным аналогам. В результате этих исследований была создана новая отечественная универсальная низкодозная антирабическая этанол-вакцина «УНИРЭВ» (Патент РФ № 2366457, 2009). Консервирующим компонентом является этанол, который в используемой концентрации оказался безвредным для животных. Приготовленные в биореакторах на микроносителях 3 экспериментальные серии вакцины имели иммуногенную потенцию на уровне 2,4-3,1 МЕ/мл для щенят и 1,7-2,1 для котят (табл. 4).

Таблица 4 – Вируснейтрализующая активность антирабических антител (МЕ/мл) в сыворотке крови иммунизированных домашних животных

Наименование препарата	Иммунизированные животные (n=3)		Эффективность этанол-вакцины, опыт/контроль	
	щенята	котята	щенята	котята
Этанол-вакцина	2,87±0,4	1,90±0,2	2,87/1,23	1,90/0,47
Контроль (без этанола)	1,23±0,1	0,47±0,1	2,3 раза	4,0 раза

При хранении полученных серий вакцины «УНИРЭВ» в течение 24 месяцев при 6-8 °С было установлено, что иммуногенность препарата снижается всего лишь на 6,9-12,4 % и остается в пределах, превышающих требования к производимым в России вакцинам. По этим показателям вакцина не уступает лучшим на данный момент зарубежным аналогам Rabisin и Defensor, но в отличие от них не содержит антибиотиков и ртути содержащих препаратов.

Список литературы

1. Черкасский, Б.Л., Хадарцев, О.С., Мовсесянц, А.А. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации. // Бешенство. – №1. – 2005. 2. Письмо Россельхознадзора «Об ухудшении эпизоотической обстановки по ряду заразных болезней животных в Российской Федерации» от 10 сентября 2010. // fsvps.ru > Федеральная служба > Новости 2453.html. 3. Ковалев, Н.А., Бучукири, Дж.В., Усеня, М.М. Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства. // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – №2. – 2007. – серыя аграрных навук. 4. Кузнецов, П.П., Иванов, В.С., Кузнецова, С.В. Антирабическая вакцина из фиксированного штамма вируса бешенства, адаптированного к перевиваемой линии клеток ВНК-21//21-й Всемирный ветер. конгресс. – Москва. – 1979. – С. 38.

BASIC DIRECTION OF DEVELOPMENT AND INTRODUCTION OF ANTIRABIC VACCINES FROM THE STRAIN SCHELKOVO-51

Puhova N.M., Samuylenko A.Ya., Yeremets V.I., Yeremets N.K., Ivanov I.V., Salov D.A., Lihasherstova S.V.

All-Russian Scientific Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo

Krasutkin S.N.

FSUP "Schelkovskiy Biocombine"

The antirabic vaccines prepared from inactivated virus of the strain "Schelkovo-51", reproduced in culture of cells BHK-21, for the first time in the world have been developed in ВНИТИБП and introduced at the Schelkovo bioindustrial complex. On quality indicators they didn't concede to the best foreign samples, and in an immunogenicity surpassed. With development of a science and new methods in biotechnology of a vaccine will constantly be improved. Along with economic indicators of manufacture of preparations, works on rising of an immune potency, stability, universality in application are conducted.

УДК 619:616-036.22:578

СОЗДАНИЕ НАЦИОНАЛЬНОГО ОТРАСЛЕВОГО СТАНДАРТА ИММУНОГЕННОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

Пухова Н.М.¹, Самуйленко А.Я.¹, Иванов И.В.¹, Еремец Н.К.¹, Еремец В.И.¹, Елаков А.Л.², Пестова Г.В.³

¹ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» РАСХН, г. Щелково, Московская обл.

²ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»,

³ФГУП «Щелковский биокOMBинат»

Во всем мире для определения иммуногенной потенции антирабических вакцин, широко используется рекомендованный ВОЗ метод национальных институтов здоровья США – NIH. При этом предусмотрено обязательное использование соответствующих стандартов и выражение получаемых результатов в Международных единицах (МЕ).

Международные стандарты антирабических препаратов готовятся в лаборатории биологических стандартов SSI (Копенгаген, Дания) и, как все другие стандарты, имеются в очень ограниченном количестве, поэтому их не рекомендуют применять для рутинного использования, они предназначены только для калибровки национальных стандартов. Их держателем и распространителем является Национальный институт биологических стандартов и контроля (NIBSC, Potters Bar, Великобритания).

Стандарты иммуногенной активности представляют собой референс-вакцины с точно установленной и откалиброванной по предыдущему стандарту активностью, выраженной в МЕ. Их готовят с соблюдением требований GMP, контролируют на безопасность и, так как в составе препарата имеется человеческий альбумин, обязательно тестируют методом ПЦР на отсутствие HBsAg, анти-HCV, анти-HCV RNA. Начиная с 5-го Международного стандарта введено обязательное определение количества гликопротеина и рибонуклеопротеина.