

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

реакторного способа – возрастала 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 биокOMBINATE.

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	котят	щенята	котят
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 ртутьсодержащих 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>Новости2453.html.
3. Ковалев, Н.А., Бучукири, Дж.В., Усень, 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. – серія 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 ВНИИБП 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 биокOMBINATE»

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.

Цель наших исследований заключалась в получении национального отраслевого стандарта иммуногенности антирабических вакцин, что диктовалось необходимостью стандартизации методов контроля изготавливаемых в стране препаратов и приведения получаемых при этом показателей к единому международному знаменателю.

Материал и методы. В работе использовали 2, 3, 4 и 5-ый международные стандарты антирабической вакцины. 5-ый стандарт приготовлен из вируса шт. Pitman Moore, репродуцированного в культуре клеток Vero, инаktivированного β-пропиолактоном. Вирус очищен ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы, смешан со стабилизирующей средой, состоящей из Игла-Эрла ВМЕ, человеческого сывороточного альбумина и мальтозы и высушен лиофилизацией.

В качестве первого претендента на отечественный стандарт была выбрана сухая культуральная антирабическая вакцина из штамма Щелково-51, инаktivированного β-пропиолактоном. Готовую вакцину выдерживали 30-40 дней при комнатной температуре, и затем помещали на постоянное хранение при минус 35-40 °С. Препарат контролировали по внешнему виду, цвету и времени ресуспензирования, определяли массовую долю влаги (по ГОСТ 24061), стерильность (по ГОСТ 28085), полноту инаktivации и безвредность.

Для определения полноты инаktivации из объединенной пробы (из трех флаконов) вводили 10 мышам интрацеребрально по 0,03 см³. Препарат считался инаktivированным, если все мыши оставались живыми и здоровыми в течение 14 суток.

Для определения безвредности проводили те же процедуры, только пробу вакцины вводили 10 мышам подкожно по 0,5 см³. Вакцина считалась безвредной, если все животные остались живыми и клинически здоровыми в течение 14 суток.

Иммуногенную активность проверяли методом НИИ на белых мышах в сравнении с международным стандартом иммуногенности антирабических вакцин. По этому методу определяли конечное разведение вакцины, защищающее 50 % белых мышей от заражения 5-50 ЛД стандартного штамма CVS вируса бешенства, сравнивали этот показатель с конечным разведением референс-вакцины и выражали в МЕ.

Вначале использовали 2-й международный стандарт, позже 3,4,5-й. Из содержимого ампулы международного стандарта и двух флаконов испытуемого препарата, разведенных до первоначального объема стерильным физраствором, делали четыре последовательных разведения с 5-кратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. Каждым разведением иммунизировали по 16 белых мышей внутрибрюшинно в дозе 0,5 см³ двукратно с интервалом 7 суток. Через 7 суток после второй иммунизации мышам вводили разрешающую дозу стандартного тест-штамма CVS, составляющую по предварительным данным 5-50 ЛД₅₀, интрацеребрально в объеме 0,03 см³. На контрольных (не вакцинированных) мышах титровали тест-штамм CVS. Для этого из основного разведения, используемого для заражения, готовили разведения от 10⁻¹ до 10⁻³. Каждое разведение вируса вводили по 0,03 см³ интрацеребрально 10 мышам. На основании полученных результатов рассчитывали количество вируса, взятого для заражения. Учет результатов проводили методом Риди и Менча по следующей схеме:

$$\lg KP_{50} = \lg A + \frac{50\% - B}{C - B} \times \lg D,$$

где KP_{50} – антилогарифму полученной величины;

A – обратная величина исходного разведения;

B – показатель смертности непосредственно ниже 50 %;

C – показатель смертности непосредственно выше 50 %;

D – кратность разведения.

Активность испытуемой вакцины определяли в МЕ относительно активности международного стандарта иммуногенности по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \times Y,$$

где: X – иммуногенная активность испытуемой вакцины в МЕ;

A – обратная величина KP_{50} испытуемой вакцины;

B – обратная величина KP_{50} международного стандарта иммуногенности;

Y – количество МЕ/см³ в основном разведении международного стандарта иммуногенности, используемого в опыте.

Иммуногенная активность испытуемой вакцины должна быть не менее 1,0 (соответствует одной Международной единице – 1 МЕ/см³).

Определение иммуногенности проводили не менее, чем в 5 повторностях, после чего вычисляли среднее значение (отдельные показатели не должны отличаться от среднего значения более, чем на 0,2 МЕ).

Результаты исследований. Впервые в стране был создан и проконтролирован национальный отраслевой стандарт, который несмотря на разнообразие антирабических вакцин позволял объективно оценивать их иммуногенную потенцию унифицированным методом НИИ. Этот принцип контроля иммуногенности антирабических вакцин нашел свое отражение в соответствующих разделах технологической документации на вакцины из штамма Щелково-51. На препарат были утверждены Технические условия ТУ 10-19-58-89. Исследования показали (табл.1), что 1-ый отечественный отраслевой стандарт, откалиброванный по 2-му международному стандарту, в процессе хранения не потерял своей активности и был пригоден в качестве эталона иммуногенности в течение 6 лет. В 1998 г. запасы этого препарата были исчерпаны, и по ТУ 10-19-58-89 был приготовлен новый эталонный препарат. После проведения контроля по общепринятым вирусологическим методам, рекомендованным ВОЗ для работы с вирусом бешенства (1975-1996 гг.) и калировки его по 4-му международному стандарту, он был утвержден в 1999 г. в качестве стандарта иммуногенности.

Таблица 1 – уногенная активность отечественных референс-вакцин относительно международных стандартов в МЕ/см³

№ референс-вакцины	№ международного стандарта				Утвержденная документация
	2	3	4	5	
1 (С-89)	≥1,0	1,05	1,27	1,08	ТУ 10-19-58-89
4 (С-98)	-	-	1,2	-	-
5 (1-06)	-	-	-	1,8	СТО 00494189-0042-2010

В настоящее время в России действует 5-ый национальный Отраслевой стандарт с иммуногенной активностью – 1,8 МЕ/см³, изготовленный во ВНИИБП по ТУ 9384035-0048915-03 и откалиброванный с участием ВГНКИ по 5-му Международному стандарту. Он хранится в стабильных по температуре условиях -20 °С в ФГУ ВГНКИ и в ГНУ ВНИИБП.

Исследования показали, что эталонный препарат в процессе хранения не снижает своих качественных показателей (табл. 2).

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

Таблиця 2 – из качества референс-вакцины (сер.1-06) в процессе хранения

Дата титрования	Обратная величина 50 % конечного разведения референс-вакцины, ЭД	Иммуногенная активность, МЕ/см ³	Timp CVS, ЛД ₅₀ /0,03 см ³
Декабрь, 2008 г.	2,63	1,8	2,8
Среднее за 2010 г.	2,71±0,1	1,8	2,35±0,22

Полученные результаты показали, что отечественная референс-вакцина позволяет объективно оценивать иммуногенную потенцию антирабических вакцин в международных единицах.

Национальный стандарт является обязательным препаратом, используемым при контроле иммуногенности каждой серии антирабической вакцины, выпускаемой предприятиями-изготовителями в Российской Федерации, а также в НИИ при проведении сертификационных и других испытаний.

CREATION OF THE NATIONAL BRANCH STANDARD OF IMMUNOGENICITY OF RABIES VACCINES

Puhova N.M.¹, Samuylenko A.Ya.¹, Ivanov I.V.¹, Yeremets N.K.¹, Yeremets V.I.¹, Elakov A.L.², Pestova G.V.³

¹All-Russian Scientific Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo, Russian Federation,

²All-Russian State Center of Quality and Standardization of Drugs for Animals and Feeds,

³FSUP "Schelkovskiy Biocombine"

The national branch standard which allow to estimate objectively an immunogenic potency of all rabies vaccines which are let out in Russia, by means of unified method NIH that promotes quality maintenance of let out production.

УДК 619:616.988:578.74

ОТРИМАННЯ АНТИГЕНІВ РЕОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ НЕПРЯМОГО ВАРІАНТУ ІФА

Рябінін С. В., Терещенко О. В., Шомін О. А.

Інститут птахівництва НААН

Для успішної боротьби з реовірусною інфекцією необхідна швидка і якісна діагностика, а також засоби профілактики. Для ретроспективної діагностики реовірусної інфекції використовують реакцію нейтралізації (РН), реакцію дифузної преципітації (РДП) та імуноферментний аналіз (ІФА) [1, 5, 6, 7, 9]. Перевагами ІФА – є висока чутливість та специфічність, що досягається ступенем очищення та концентрування антигену, який використовується в постановці реакції [3, 4, 8].

Метою наших досліджень було отримання концентрованого та високоспецифічного антигену реовірусу птиці, придатного для розробки вітчизняної діагностичної тест – системи на основі непрямого варіанту ІФА.

Матеріали і методи досліджень. В дослідженнях були використані патогенні штами реовірусу: штам «1733», який був виділений Rosenberger [9] у 1983 році в Нідерландах від хворих курчат, та місцевий штам Br – 06 виділений в ІП НААН від курчат-бройлерів у 2006 році, та ідентифікований ВНДІЗТ (м. Володимир). Штами депоновані в ДНКІБШМ (м. Київ) в липні 2008 року і зберігаються у відділі профілактики хвороб птиці ІП НААН у ліофільно висушеному стані за температури -20° С. Вірусотримуючий матеріал – культуральна розплідка штамів з титром вірусу 6,0-6,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Мікроскопію вірусу проводили електронним мікроскопом ПЭМ-125К при прискорюючому напруженні 75 kV, що має в своєму складі систему зйомки та аналізу зображення САІ – 01А на основі CCD камери DX – 2 в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини (м. Харків).

Електронна мікроскопія здійснювалася методом негативного контрастування [2].

Результати досліджень. З метою звільнення від клітинного дебрису вірус заморожували на стінках ролерних флаконів за температури -20° С з наступним відтаюванням до 4° С, тричі. Надалі його інактивували етиленіміном у концентрації 0,1 % протягом 24 годин за температури 37,5° С.

Подальше очищення та концентрування проводили за двома методиками:

Перша методика. Попереднє очищення проводилося з використанням хлороформу (20 % від загального об'єму) та низькошвидкісного центрифугування (2000g 15-20 хвилин). Далі супернатант обробляли 7 % поліетиленгліколем (ПЕГ 6000), осад збирали центрифугуванням та ресуспензували в TSE – буфері.

На завершальному етапі вірус осаджували через розчин 30 % – ї сахарози при 70000g на ультрацентрифузі протягом 3 годин, отриманий осад ресуспензували в TSE – буфері.

Друга методика відрізнялася від першої тим, що на етапі попереднього очищення використовували обробку вірусвміщучого матеріалу 7 % поліетиленгліколем (ПЕГ 6000) після чого матеріал обробляли ультразвуком (22 кГц). Завершальний етап очищення вірусу не відрізнявся від першої методики.

Однорідність і чистоту вірусу контролювали під електронним мікроскопом (рис. 1).

Отримані антигени сенсibiliзували на планшети у концентрації 0,02-0,05 мг/мл та проводили непрямий варіант ІФА з позитивними референтними сироватками титр яких становив не менше 1:3200, що вказує на достатню активність антигену. У специфічних гетерологічних сироватках, що входять до складу комерційних наборів фірми BioChek та «Сінко» ВНДІЗТ (для визначення антитіл до інфекційного бронхіту курей, синдрому зниження несучості, мікоплазми, ньюкаслської хвороби, хвороби Гамборо) не виявлено позитивних та сумнівних титрів до реовірусної інфекції, що вказує на специфічність отриманих антигенів по відношенню до гомологічних антитіл.

Оцінка стабільності антигенів, очищених двома методами, при зберіганні на планшетах, показала різні результати. Перевірку проводили через кожні 7 днів протягом 10 тижнів в умовах штучного старіння при 37° С. Активність реовірусного антигену, очищеного та концентрованого з використанням ультразвуку, протягом досліджуваного періоду не знижувалася. При використанні в якості антигену для сенсibiliзації планшетів препарату отриманого очищенням хлороформом, вже після 4-го тижня зберігання спостерігалось значне зниження активності в ІФА (рис. 2).