

Е.А. ТКАЧЕНКО¹, А.А. ИШМУХАМЕТОВ², Т.К. ДЗАГУРОВА¹, А.А. СИНЮГИНА², Н.А. КОРОТИНА¹,
И.А. НАБАТНИКОВ¹, С.Е. СОЦКОВА¹, М.В. БАЛОВНЕВА¹, А.Е. МАЛКИН²

Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространенный в Евразии, а в России занимающий одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека. Случаи заболевания ГЛПС регистрируются в 58 из 83 административных регионов РФ и составляют ежегодно 8—10 тыс. больных в целом по стране. 98% от общего числа случаев ГЛПС в России регистрируются в европейских регионах и 2% — в азиатских, главным образом на Дальнем Востоке [1].

По данным Роспотребнадзора, только за 15 лет XXI в. было зарегистрировано более 108 тыс. случаев ГЛПС в 7 из 8 федеральных округов, включая более 2,5 тыс. детей в возрасте до 14 лет. У более 400 больных ГЛПС тяжелое клиническое течение болезни закончилось летальным исходом (рис. 1).

Результаты анализа структуры заболеваемости ГЛПС в России свидетельствуют

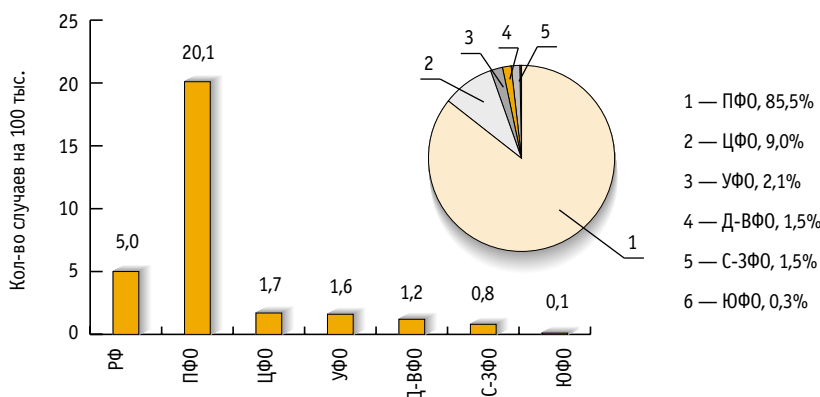
Ключевые слова:

вакцины для профилактики ГЛПС, вирус Ривталя, промышленные технологии

об этиологической роли 5 хантавирусов. 97,7% всех случаев ГЛПС в России этиологически обусловлены вирусом Puumala (рис. 2), и только 2,3% —

РИСУНОК 1 Заболеваемость ГЛПС в России за период с 2000 по 2014 г.

ГЛПС	РФ*	ПФО	ЦФО	УФО	Д-ВФО	С-ЗФО	ЮФО
Кол-во больных	108 078	92 714	9 686	2 232	1 602	1 562	273
Дети до 14 лет	2 674/2,5%	2 934/2,6%	132/1,4%	77/3,4%	52/3,2%	11/0,7%	8/2,9%
Летальность	433/0,4%	312/0,3%	37/0,4%	4/0,2%	61/3,8%	7/0,4%	12/4,4%



* РФ — Российская Федерация, ПФО — Приволжский федеральный округ, ЦФО — Центральный федеральный округ, УФО — Уральский федеральный округ, Д-ВФО — Дальневосточный федеральный округ, СЗФО — Северо-Западный федеральный округ, ЮФО — Южный федеральный округ.

SUMMARY

Keywords: HFRS, hantavirus Puumala, vaccine immunogenicity

Among zoonotic virus infections and all other natural focus diseases for humans, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) with its morbidity rate leads in Russia. A total of more than 108,000 HFRS cases were registered in Russia for the period of last 15 years. The prevention of the HFRS disease mainly includes measures aimed at reducing exposure to live rodents and their excreta. However, rodent control measures are expensive and difficult to maintain over long periods because it is practically impossible to eradicate the rodent hosts of the hantaviruses from nature. Hence it is obvious that the most prospective and effective measure for decreasing HFRS morbidity in endemic regions of Russia could be regular and massive vaccine prophylaxy against the disease.

MANUFACTURING TECHNIQUES AND METHODS OF CONTROL OF THE INACTIVATED VERO CELL-DERIVED VACCINE AGAINST HFRS HAS BEEN DEVELOPED IN RUSSIA.

другими вирусами: Hantaan, Amur и Seoul (все вместе — 1,5%) и двумя генотипами (Kurkino и Sochi) вируса Dobrava/Belgrade (0,8%), что указывает на ведущую этиологическую роль вирусов серотипа Puumala в структуре заболеваемости ГЛПС в России.

Широкое распространение, высокие показатели заболеваемости людей, значительная частота тяжелых форм течения болезни, сопровождающихся длительным периодом пониженной трудоспособности, отсутствие специфических средств лечения и профилактики обуславливают высокую социальную и медицинскую значимость проблемы ГЛПС в России. Социально-экономические потери усугубляются также тем, что из числа заболевших геморрагической

¹ ФГВНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва.

² ФГУП «Предприятие по производству вирусных и бактериальных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва.

лихорадкой до 85% составляют мужчины в возрасте от 20 до 40 лет, т. е. наиболее продуктивная часть населения.

Из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация. Дератизационные мероприятия обходятся довольно дорого, а их применение обеспечивает лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и не решает проблемы ликвидации природного резервуара хантавируса.

Наиболее эффективным методом борьбы с ГЛПС является вакцинопрофилактика, что было продемонстрировано на протяжении последних 20 лет в Китае, Южной и Северной Корее. Однако вакцины против ГЛПС, производимые в этих странах на основе вирусов Hantaan и Seoul, не обладают защитным действием против вируса Puumala — основного возбудителя ГЛПС у жителей европейской части России, на которую приходится около 98% всей заболеваемости, регистрируемой в России. Трудности с разработкой культуральной вакцины против хантавируса Puumala довольно долго оставались нерешенными, в основном из-за ограниченного выбора чувствительных к размножению этого вируса клеточных культур, низкого уровня репродукции вируса, отсутствия цитопатогенного действия.

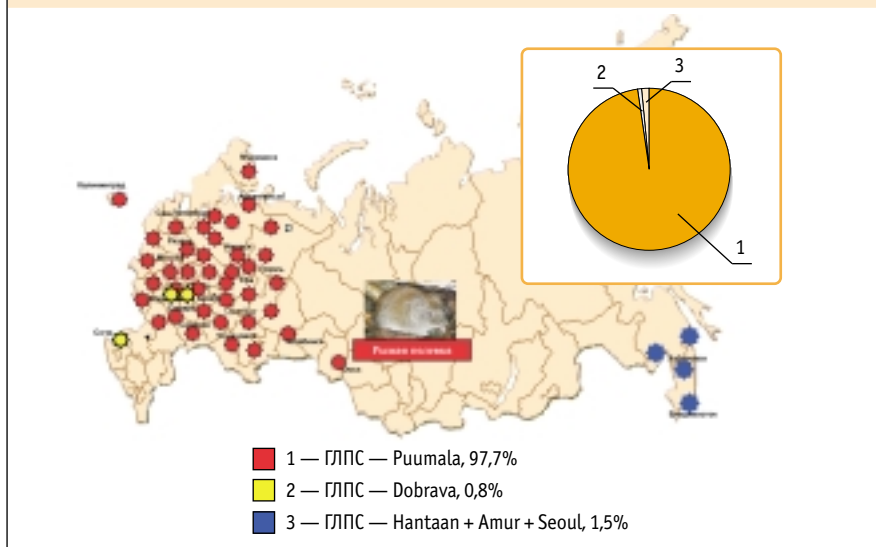
Следует отметить, что материальные затраты, связанные с лечением одного больного ГЛПС, составляют ориентировочно 60–90 тыс. руб. Соответственно, с учетом средней ежегодной заболеваемости в России (10 тыс. больных) затраты могут составить более 600 млн руб.

При ориентировочной стоимости 1 дозы вакцины 200 руб. затраты на проведение полной трехкратной вакцинации одного человека составят приблизительно 700 руб., т. е. в тысячу раз меньше затрат на лечение.

Кроме того, ежегодные финансовые затраты на проведение дератизационных работ на эндемичных по ГЛПС административных территориях (а их только в европейской части России не менее 30) составляют от 15 до 20 млн руб. на каждую область.

Население эндемичных территорий, нуждающееся в вакцинопрофилактике

РИСУНОК 2 Соотношение случаев ГЛПС, обусловленных разными видами хантавирусов



этой инфекции, составляет только в России около 20 млн человек, что обуславливает высокую коммерческую ценность вакцины и, соответственно, значительную финансовую прибыль от реализации вакцины.

Создание вакцины против ГЛПС и ее широкое внедрение в практику здравоохранения позволят в значительной степени уменьшить тяжесть социально-экономических последствий, связанных с высокой заболеваемостью ГЛПС, сопровождающейся нередко летальным исходом.

В связи с вышеизложенным одной из наиболее актуальных и приоритетных в настоящее время проблем является разработка технологии изготовления вакцинных препаратов против ГЛПС, эффективных для применения в России и отвечающих современным требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.

● **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ, ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЛПС**

При изготовлении вакцины ГЛПС в качестве субстрата для размножения хантавируса Puumala использовали линию перевиваемых клеток почек зеленой мартышки VERO, полученную из ВОЗ (WHO Vero cell bank from ECACC, Accession number 991042). Линия клеток VERO аттестована и рекомендована

в качестве возможного субстрата для производства инактивированных вакцин (протокол №3 заседания ученого совета ГИСК им. Л.А. Тарасевича от 20 марта 2003 г. и протокол №3 от 22 мая 2003 г. Комитета медицинских иммунобиологических препаратов). Использование этой линии клеток для производства инактивированной вакцины ГЛПС стало возможным в результате успешной адаптации штамма ТКД/Уфа-97 вируса Puumala, выделенного из крови больного ГЛПС в Башкирии, к размножению в клетках VERO. Адаптированный в процессе 20-кратного пассирования в культуре клеток VERO хантавирусный штамм не мог, однако, непосредственно использоваться в качестве посевного вируса, поскольку ранее его культивировали на перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (линия клеток VERO-E6). Несмотря на то что по паспорту культура клеток VERO-E6 не обладала туморогенностью и не содержала посторонних агентов, тем не менее полностью нельзя было исключить возможность контаминации штамма нежелательными компонентами, в т. ч. возможными онкогенами. В связи с этим была проведена очистка штамма от посторонней ДНК путем обработки ДНКазой и последующей очистки зональным ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. В результате получена соответствующая фракция вируса, которая после фильтрования через фильтр

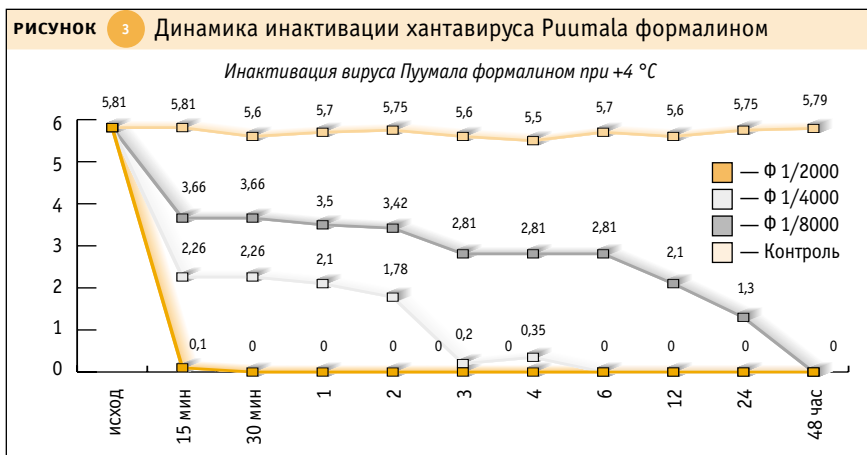
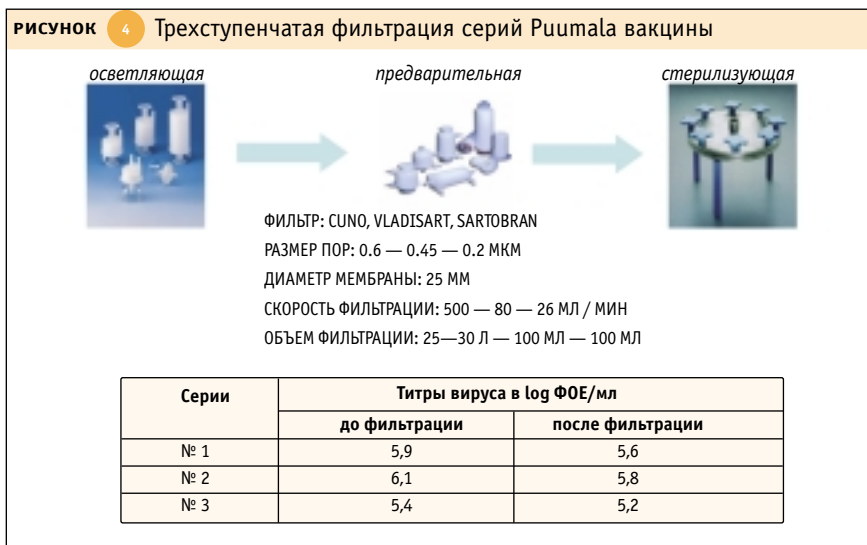


ТАБЛИЦА 1 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей М-сегмента вакцинного штамма ПУУ-ТКД/VERO (с 172 по 1 239 нп)

	Штаммы вируса Puumala					Hantaan
	Уфа-97	ТКД/VERO	К-27	Р-360	CG-1820	76-118
ТКД/Уфа-97		99,8	99,7	99,8	99,5	60,1
ПУУ-ТКД/VERO	99,9		99,8	99,5	99,6	60
К-27	99,9	99,7		99,7	99,1	60,5
Р-360	99,7	99,8	99,9		92,3	60,2
CG-1820	99,4	99,3	99,5	99,5		60,1
76-118	59,3	58,1	58,4	59,3	59	



0,22 мкм была использована для обработки штаммового запаса вируса, который был охарактеризован по всем требованиям, предъявляемым к аналогичным препаратам, включая тесты на специфическую идентичность, стерильность, отсутствие микоплазм, клеточной ДНК и т. д. (Сборник инструкций по общим методам контроля МИБП, утвержденный приказом Госкомсанэпид-

надзора РФ от 31.10.96). Перечисленные контроли осуществлены дважды: на уровне производственных штаммов и собственно посевных вирусов. Аттестованный посевной штамм ТКД/Уфа-97 (табл. 1) был использован для накопления вирусосодержащего материала, послужившего основой для изготовления экспериментальных серий вакцинного препарата.

Таким образом, проведенная нами очистка хантавирусного штамма, адаптация его к перевиваемой культуре клеток VERO, использование данной культуры в качестве культуры-продуцента, аттестация посевного штамма в соответствии с требованиями регламентирующих документов позволили разработать технологию изготовления лабораторных серий инактивированной вакцины против ГЛПС на основе вируса Puumala.

В результате изучения кинетики инактивации было показано, что в очищенном вирусосодержащем субстрате, обработанном 0,05%-ным раствором формалина, инфекционная активность вирусов не определялась по истечении экспозиции в течение 30 мин. При обработке 0,025- и 0,0125%-ным раствором формалина время инактивации вируса увеличивалось до 6 и 48 ч, соответственно (рис. 3). Как и в случае с выбором температурного режима, руководствуясь желанием избежать повреждений структуры белков и сохранить максимальную антигенную активность инактивированного продукта, было принято решение об использовании в дальнейшем 0,025%-ного раствора формалина. С учетом запаса надежности предложенная схема инактивирования инфекционной активности хантавируса включает экспозицию вирусосодержащего субстрата при температуре 6 ± 2 °С в присутствии 0,025%-ного раствора формалина в течение 30 сут.

Концентрирование вируса проводили методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке. На первом этапе очистки балластные компоненты удаляли с помощью осветляющей фильтрации, используя фильтр Poly Pro XL (CUNO) с размерами пор и площади поверхности 0,6 мкм и 0,14 м² соответственно. Второй этап — гель-фильтрация с использованием Sepharose 6 FF и хроматографа АКТА purifier (GE Healthcare). Для оптимизации процессов, осуществляемых на каждом из этих этапов, были изучены и определены параметры взаимодействия вируса с разными пористыми сорбентами. В результате проведенных исследований отобрана гель-фильтрационная схема очистки вируса, приводящая к получению высокоактив-

ных препаратов, удовлетворяющих требованиям к чистоте конечного продукта (рис. 4–6).

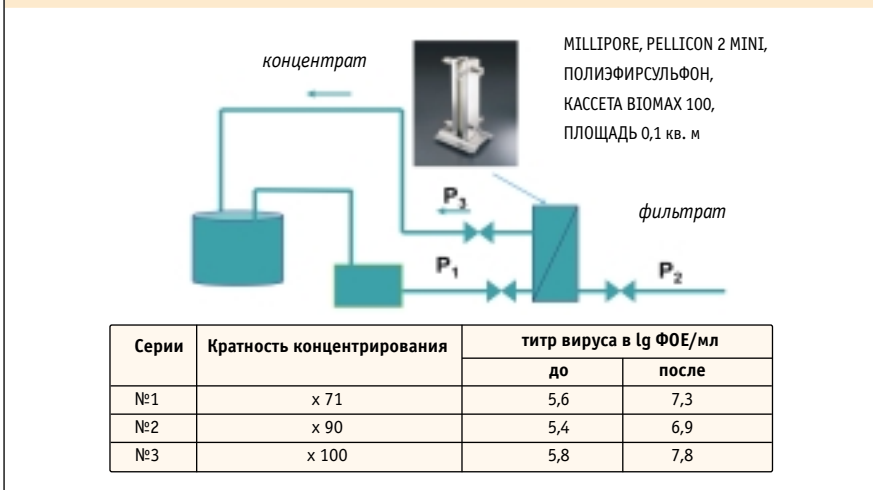
Из инактивированной формалином сконцентрированной и очищенной антигенсодержащей культуральной жидкости после стерилизующей фильтрации через фильтр «Миллипор» с размером пор 0,22 мкм получали вакцинный препарат.

Следует отметить, что практически на всех этапах изготовления вакцины, начиная от получения производственного штамма вируса и кончая готовой формой вакцины, предусмотрены физико-химические и молекулярно-биологические тесты, а также контроль на животных и в культуре клеток (табл. 2). Эта система надежно обеспечивает безопасность применения новой вакцины, высокий уровень и стабильность ее иммунологической активности. Отсутствие туморогенности обеспечено за счет резкого снижения на стадии гель-фильтрации содержания клеточной ДНК (менее чем 10 нг в одной вакцинной дозе). Таким образом, вакцинный препарат представляет собой инактивированный вирус Puumala.

На завершающей стадии приготовления вакцины ГЛПС определяли антигенную активность и рассчитывали рабочую дозу (РД) вакцинного препарата. В соответствии с предварительно установленным соотношением зависимости между количеством содержащегося в вакцине специфического антигена и ее иммуногенной активностью минимальная иммунизирующая доза (МИД), т. е. максимальное разведение исходного препарата, обеспечивающее продукцию вируснейтрализующих антител у 50% животных, соответствовало 8 антигенным единицам (АЕ). Разведение исходного препарата, содержащего 4 МИД или 32 АЕ, принимают за 1 РД вакцины.

Специфическую активность инактивированной вакцины характеризовали по иммуногенности на мышах Balb/c, т. е. по способности препарата индуцировать у животных продукцию специфических хантавирусных антител. Для оценки иммуногенности готовую адсорбированную вакцину вводили не менее чем 6 мышам линии Balb/c 9–10-недельного возраста весом 18–20 г

РИСУНОК 5 Концентрирование Puumala вакцины методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке



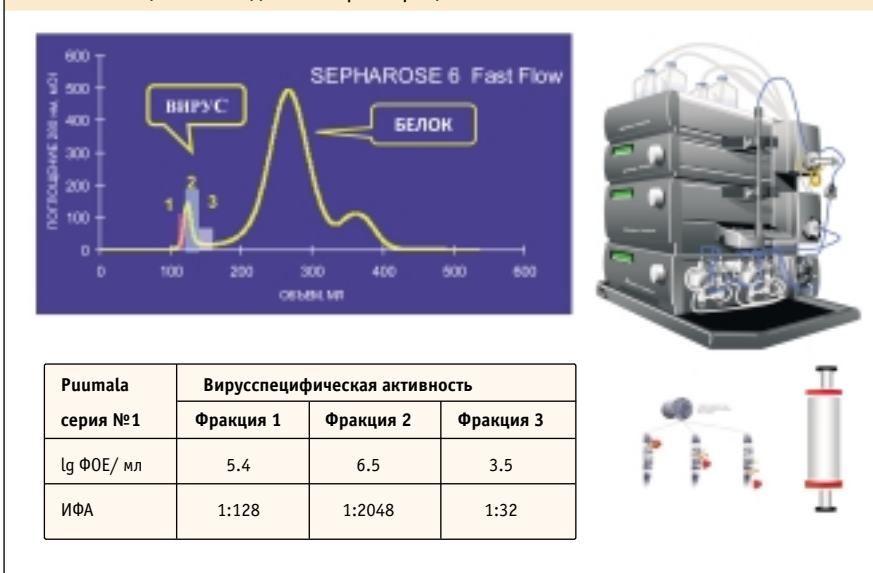
в объеме 0,5 мл подкожно трехкратно с 2-недельным интервалом, используя для одной иммунизации 1 РД готовой вакцины. В качестве контрольных использовали мышей Balb/c, которым в те же сроки вводили адсорбент гидроокись алюминия. Через 2 нед после последней инъекции у животных брали из орбитальной вены кровь и готовили из нее сыворотку. В полученных сыворотках крови определяли титр вируснейтрализующих антител к штамму ТКД/Уфа-97 хантавируса Puumala, используя метод ФОЕ.

Все 3 лабораторные серии вакцины индуцировали антивирусные антитела у 100% животных и в довольно высоких титрах (табл. 3).

Средний арифметический титр нейтрализующих антиPuumala-антител после иммунизации мышей Balb/c адсорбированной вакциной по результатам испытания 3 серий вакцины составил 1:90.

Таким образом, из приведенных выше данных следует, что разработанные препараты вакцины ГЛПС обладают выраженной иммуногенной активностью. Остается невыясненным, какова же реальная доза вакцины, способная защитить человека от инфекции. По литературным данным, производимая в Китае вакцина против хантавируса Hantaan, вызывающая при иммунизации кроликов продукцию специфических вируснейтрализующих антител с титрами

РИСУНОК 6 Очистка первичного концентрата Puumala вакцины методом гельфильтрации



1:10, способна оказать 100%-ный протективный эффект при трехкратной вакцинации людей.

При введении препарата готовой адсорбированной вакцины мышам линии Balb/c не наблюдалось кожных уплотнений в местах введения, гиперемии кожи или абсцессов. Предполагается, что побочное действие инактивированной вакцины ГЛПС будет аналогичным, как и у близких препаратов типа инак-

тимизация условий концентрирования, очистки и инактивирования вируса, а также разработка методов контроля позволили создать на основе отечественного штамма вируса Puumala культуральную, инактивированную, концентрированную, очищенную, сорбированную вакцину против ГЛПС.

Лабораторные серии вакцины успешно прошли тестирование с использованием регламентированных методов кон-

шить проблему вакцинопрофилактики ГЛПС в своих странах.

Приняв за основу технологию изготовления коммерческой вакцины против японского энцефалита, разработанную в 1976 г. [4], авторами были приготовлены и испытаны 9 модификаций инактивированной мозговой вакцины против ГЛПС [5–11].

Культуральные хантавирусные вакцины были созданы только в Китае, при этом в качестве субстрата для четырех модификаций авторы использовали клетки почек золотистого хомяка [6, 10, 12] и почек монгольской песчанки [11, 13, 15] и для одной модификации — клетки куриных эмбрионов [14].

Помимо инактивированных цельновирионных вакцин, к настоящему времени авторами, главным образом в США, предприняты попытки создания рекомбинантных генно-инженерных хантавирусных вакцин. К ним относятся четыре вакцины на основе субклонированных кДНК, представляющих М- и S-сегменты РНК-вируса Hantaan, встроенных в геном вируса осповакцины [16, 17] и в геном вируса Sindbis [18], а также вирусов Seoul и Sin Nombre, встроенных в геном цитомегаловируса [19, 20]. На лабораторных животных была показана иммуногенная и протективная активность рекомбинантных вакцинных препаратов в отношении соответствующих хантавирусов. Вместе с тем при испытании таких препаратов (на основе встроенных в геном вируса осповакцины сегментов генома Hantaan) на волонтерах было установлено, что среди ранее привитых против оспы процент выявления вируснейтрализующих антител к вирусу Hantaan составлял лишь 26%, в то время как у не привитых — 72% [21]. Очевидно, низкие показатели иммунного ответа к хантавирусу — следствие некорректного выбора носителя, но вовсе не отсутствие перспективы у самой идеи создания рекомбинантной вакцины.

В последнее десятилетие интенсивно разрабатывается новый класс противовирусных вакцин, т. н. ДНК-вакцин [22, 23]. Их отличает полноформатный защитный эффект (одновременно «гуморальный» и клеточный), а также безопасное производство (когда речь идет о хантавирусах), снятие пробле-

ТАБЛИЦА 2 Характеристика вакцинного препарата на технологических этапах

Стадии очистки	Объем (л)	Титр вируса lg ФОЕ/мл	ИФА (N белок) log ₂ /0,05 мл	ИФА (Gn/Gc белок) log ₂ /0,05 мл
Сбор КЖ	25	5,8	1 024	512
Фильтрация	25	5,6	512	256
Концентрирование	0,35	7,3	8 192	2 048
Гель-фильтрация	0,7	6,9	4 096	1 024
Инактивирование	0,7	0	4 096	1 024

ТАБЛИЦА 3 Результаты исследований на иммуногенность 3 серий вакцины ГЛПС

Наименование препарата	Доза препарата, мл	Отношение числа животных с сероконверсией к общему числу	САТ антиПУУ-антител в сыворотке животных *
Серия №1	0,5	6/6	125
Серия №2	0,5	— “ —	80
Серия №3	0,5	— “ —	75
Плацебо	0,5	0/6	<10

* Среднеарифметический титр нейтрализующих антител (обратное значение) после трехкратного введения по одной дозе с интервалом 14 дней.

тивированной полиомиелитной вакцины, инактивированной вакцины клещевого энцефалита и др. Нет оснований ожидать каких-либо серьезных осложнений при вакцинации этим препаратом ввиду его высокой степени очистки.

Таким образом, проведенная нами адаптация штамма хантавируса Puumala к перевиваемой культуре клеток VERO и возможность использования данной культуры в качестве культуры-продуцента, аттестация вакцинного штамма ПУУ-ТКД/VERO в соответствии с международными требованиями, оп-

троля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям (табл. 4).

● ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Начало исследований по созданию хантавирусных вакцин приходится на середину 80-х гг., когда методы выделения и культивирования хантавирусов в лабораторных условиях стали доступны для широкого применения. Пионерами этих исследований были ученые из Японии, Китая, Северной и Южной Кореи, при этом в итоге китайским и корейским ученым удалось успешно ре-

ТАБЛИЦА 4 Аттестация экспериментальных лабораторных серий вакцины ГЛПС на соответствие требованиям, предъявляемым к культуральным инактивированным вирусным вакцинам

Показатель	Нормы	Серия №1	Серия №2	Серия №3
Описание	Непрозрачная суспензия	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	По разделу «специальная активность»	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Титр АГ	Не менее 1:128	1:512	1:512	1:512
pH	От 7,4 до 7,8	7,68	7,69	7,68
Полнота сорбции АГ	От 80 до 100%	99%	99%	99%
Бактерии	Не более 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ Апирогенна	Менее 25 ЕЭ Апирогенна	Менее 25 ЕЭ Апирогенна
Пирогенность	Должна быть апирогенна	Апирогенна	Апирогенна	Апирогенна
Токсичность	Должна быть нетоксична	Нетоксична	Нетоксична	Нетоксична
Стерильность	Должна быть стерильна	Стерильна	Стерильна	Стерильна
Микоплазмы	Не должна содержать микоплазм	Не содержит	Не содержит	Не содержит
Формальдегид	Не более 0,01 мг/доза	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/доза	1,13 мг/доза	1,07 мг/доза	1,06 мг/доза
Специфическая безопасность	Не должна содержать живого вируса	Не содержит	Не содержит	Не содержит
Специфическая активность	Титр нейтрализующих АТ к хантавирусу РУУ в иммунных мышинных сыворотках не менее 1:16	1:32	1:16	1:64
БСА	Не более 0,5 мкг/доза	<0,5 мкг/доза	<0,5 мкг/доза	<0,5 мкг/доза
Белок	Не более 125 мкг/доза	23 мкг/доза	32,6 мкг/доза	43,8 мкг/доза
Остаточная ДНК	Не более 10 нг/доза	0,195 нг/доза	0,195 нг/доза	0,169 нг/доза

мы транспортировки готовых препаратов, связанной с необходимостью организации т. н. холодной цепочки, и др. В общем виде эти вакцины представляют собой гены протективных белков, способные контролировать в клетках вакцинируемого организма синтез протективных белков, обуславливающих формирование защитного иммунного ответа. Применительно к хантавирусам подобная ДНК-вакцина (на основе вируса Seoul) разработана в США [24, 25].

Таким образом, за последнее время отмечен явный прогресс как в изучении хантавирусов, так и в разработке вакцинопрофилактики хантавирусных инфекций. К настоящему времени лицензированы шесть хантавирусных вакцин, включая три культуральные и одну мозговую в Китае и по одной мозговой вакцине в КНДР и Южной Корее. К сожалению, ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России, поскольку все они производятся на основе хантавирусов Hantaan или Seoul и не обладают защитным действием против вируса Puumala — основного

возбудителя ГЛПС на территории европейской части России.

В России только в ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова и ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова ведутся исследования по разработке отечественных вакцинных препаратов против ГЛПС. Еще в середине 90-х гг. совместно с южнокорейскими исследователями была разработана технология изготовления бивалентной комбинированной (Puumala-, Hantaan-вирусы) вакцины против ГЛПС на основе субстрата мозговой ткани сирийских хомяков [26]. Лабораторные испытания этой вакцины на животных выявили специфический иммунный ответ к хантавирусам Puumala и Hantaan, при этом продукция вируснейтрализующих антител (основной показатель протективной активности) к обоим вирусам в ответ на введение бивалентной вакцины была более высокой, чем в ответ на введение моновалентных вакцин. Однако мозговые вакцины по сравнению с культуральными не могут удовлетворять в полной мере современным требованиям, предъявляемым к медицин-

ским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.

Помимо мозговой вакцины, сотрудники ИПВЭ им. М.П. Чумакова участвовали в конструировании аэрозольной ДНК-вакцины против ГЛПС [27, 28]. Но в результате аэрозольной и парентеральной иммунизации лабораторных животных была показана низкая иммуногенность препарата, не обеспечивающего требуемого иммунного ответа, даже если он использовался в предельно высоких концентрациях.

На сегодняшний день в качестве наиболее перспективного вакцинного препарата для применения в европейских регионах России и других европейских стран может рассматриваться культуральная вакцина, приготовленная на основе вируса Puumala.

В процессе работы над созданием оптимальной биологической схемы изготовления вакцинных препаратов были решены ключевые задачи:

◆ 1. Адаптация штамма ТКД/Уфа-97 хантавируса Puumala к размножению в культуре перевиваемых клеток почек зеленой мартышки VERO.

- ◆ 2. Аттестация вакцинного штамма ПУУ-ТКД/VERO в соответствии с международными требованиями.
- ◆ 3. Установлено преимущество роллерного способа культивирования по сравнению со стационарным способом. При этом максимальные показатели выхода вируса в культуральную жидкость при роллерном культивировании были в 10 раз выше, чем при стационарном, и составляли 6,2-6,5 lg ФОЕ/мл для штамма ПУУ-ТКД/VERO.
- ◆ 4. Показана выраженная зависимость сроков максимального выхода вируса в культуральную жидкость от множественности заражения клеток, что позволило определить оптимальные сроки и кратность сбора урожая вируса.
- ◆ 5. В результате изучения динамики инактивирования хантавирусов при разных температурных режимах и при обработке разными концентрациями формалина была выбрана наиболее оптимальная схема, включающая инактивирование вируса при температуре 6 ± 2 °C в присутствии 0,025%-ного раствора формалина в течение 30 сут.
- ◆ 6. Для определения остаточного вируса была разработана методика, включающая проведение 5 серийных пассажей исследуемого субстрата на культуре клеток VERO-E6 с исследованием лизата клеток и культуральной жидкости после каждого пассажа на присутствие вируса с помощью методов иммунофлюоресценции и фокусообразования.
- ◆ 7. Разработаны оптимальные условия концентрирования вирусов методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке и очистки первичного концентрата методом гель-фильтрации.
- ◆ 8. Для определения специфической активности вакцинных препаратов на технологических этапах их производства разработаны методы определения хантавирусных антигенов, ассоциированных с белками N, G1/G2.
- ◆ 9. Для оценки иммуногенной активности вакцинных препаратов разработана схема иммунизации мышей линии Balb/c с последующей детекцией вируснейтрализующих антител.



ИСТОЧНИКИ

1. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г., Слонова Р.А., Иванов Л.И., Транквиловский Д.В., Крюгер Д. Актуальные проблемы современного этапа изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России. ЖМЭИ, 2013, 1, 51–58.
2. Klempa B, Tkachenko E, Dzagurova T, Yunicheva Yu, Morozov V, Okulova N, G.Slyusareva, Smirnov A, Kruger D. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by two distinct lineages of Dobrava hantavirus emerging in Russia. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 2008, 14, 4, 617–625.
3. Nur Hardy Abu Daud, Hiroki Kariva, Evgeniy Tkachenko, Tamara Dzagurova, Olga Medvedkina, Petr Tkachenko, et al. Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2008, 56 (3), 151–165.
4. Oya A. Japanese encephalitis vaccine: the vaccination. *International Medical Foundation of Japan* 1976; 69–72.
5. Lee H, Ahn C, Song J et al. Field trial of an inactivated vaccine against HFRS in humans. *Arch Virol (Suppl 1)*, 1990, 35–47.
6. Cho H, Howard C. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax). *Vaccine*, 1999, 17, 2569–2575.
7. Lee HW, Chu YK, Woo YD, An CN, Kim H, Tkachenko E, Gligic A. Vaccines against HFRS. In book «Emergence and Control of Rodent-Borne Viral Diseases». France, Elsevier. 1999, 147–156.
8. Kim R, Ryu C, Kim G et al. Antibody formation and epidemiological preventive effect after vaccination with the inactivated vaccine against HFRS. *Abstracts of 2nd Symposium on Arboviruses in the Mediterranean countries*, 1989, Dubrovnik, 58.
9. Ким Р., Ру Ч., Ким Г.М. с соавт. Специфическая профилактика ГЛПС в КНДР. Тезисы международного симпозиума по ГЛПС. Ленинград, 1991, 16–17.
10. Sun Z, YU Y, Wang W, Wang D. Studies on the purified inactivated epidemic hemorrhagic fever vaccine. Clinical trial of type 1 EHF vaccine in volunteers. *Abstracts of 2nd Intern. Conference on HFRS*, 1992, Beijing, China, 109–110.
11. Chen H, Luo Z, Zhang J. Study on epidemiological efficacy and immunologic strategy of vaccines against HFRS. *Chines Public Health*, 1999, 15, 561–568.
12. Sun Z, Wang W, Sheng Y. Studies on the purified inactivated epidemic hemorrhagic fever vaccine. Clinical trial of type 2 EHF vaccine in volunteers. *Abstracts of 2nd Intern. Conference on HFRS*, 1992, Beijing, China, 111–112.
13. Zhu Z, Yu Y. The investigation on the use of the inactivated EHF tissue culture vaccine in humans. *Abstracts of 2nd Intern. Conference on HFRS*, 1992, Beijing, China, 105.
14. Dong G, An Q, Zhihue Y, Wenxue L. Efficacy of a chicken embryo tissue culture inactivated HFRS vaccine used in a clinical trial. *Abstracts of 5th Intern Confer on HFRS, HPS and Hantaviruses*, 2001, France, 239.
15. Yongxin Y, Zhiyong Z, Zhihui Y, Guanmu D. Inactivated cell-culture Hantavirus vaccine developed in China. In book «Emergence and Control of Rodent-Borne Viral Diseases». France, Elsevier. 1999, 157–161.
16. Schmaljohn C, Hasty S, Dalrymple J. Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for HFRS. *Vaccine*, 1992, 10: 10–13.
17. Chu Y, Jennings, Schmaljohn C. A Vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J of Virol*, 1995, 6417–6423.
18. Kamrud K, Nelle T, VanderZanden L, Anderson K, Schmaljohn C. Evaluation of naked DNA and alphavirus-based hantavirus vaccines. *Abstracts of 4th Intern. Confer. on HFRS and Hantaviruses*. Atlanta, USA, 1998, 95.
19. Hooper J, Kamrud K, Elgh F, Custer D, Schmaljohn C. Development and testing of DNA vaccines against hantaviruses. *Am J of Trop Med and Hyg. Supplement*. 1998, 59: 3, 124–125.
20. Bharadwaj M, Lyons C, Wortman B, Hjelle B. Genetic immunization with Sin Nombre virus cDNAs induces T cell proliferative responses and antibodies in Balb/C mice. *Am J of Trop Med and Hyg. Supplement*. 1998, 59: 3, 124.
21. McClain D, Summers P, Harrison A, Schmaljohn A, Schmaljohn C. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virology*. 2000, 60, 77–85.
22. Giese M. DNA-antiviral Vaccines: New developments and Approaches – a review. *Virus Genes* 1998; 17(3): 219–32.
23. Lai WC, Bennett M. DNA vaccines. *Crit. Rev. Immunol.*, 1998; 18 (5): 449–84.
24. Hooper J, Kamrud K, Elgh F, Custer D, Schmaljohn C. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects Seoul virus infection. *Virology*, 1999, 255, 269–278.
25. Kamrud K, Hooper J, Elgh F, Schmaljohn C. Comparison of the protective efficacy of naked DNA, DNA-based Sindbis replicon, and packaged Sindbis replicon vectors expressing hantavirus structural genes in hamsters. *Virology*, 1999, 263, 209–219.
26. Lee HW, Chu YK, Woo YD, An CN, Kim H, Tkachenko E, Gligic A. Vaccines against HFRS. In book «Emergence and Control of Rodent-Borne Viral Diseases». France, Elsevier. 1999, 147–156.
27. Filatov F, Schmaljohn C, Hooper J, Tkachenko E et al. Prospects for aerosol delivery of DNA vaccines against hantaviruses. *Abstr. of 5th Intern. Conference on HFRS, HPS, and hantaviruses*. France, Veyrier-du-Lac, 2001, 238.
28. Filatov F, Tkachenko E, Schmaljohn C, Hooper J et al. Immune response to aerosol delivery of the cloned hantavirus genes. *Abstract book. VII Intern. Conf. on HFRS, HPS and Hantaviruses*. Buenos Aires, Argentina. 2007, 187.