

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 615.371

Анализ многолетнего опыта изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества – специфическая активность (иммуногенность)

М.С. Воробьева, О.С. Афонина, О.А. Бархалева, М.С. Щербинина, К.А. Саркисян, А.В. Рукавишников, В.А. Шевцов, В.П. Бондарев

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

The analysis of a long-term experience of studying inactivated cell-culture vaccines for preventing tick-borne encephalitis of domestic and foreign manufacture in terms of specific activity (immunogenicity)

M.S. Vorobieva, O.S. Afonina, O.A. Barhaleva, M.S. Shcherbinina, K.A. Sarkisyan, A.V. Rukavishnikov, V.A. Shevtsov, V.P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Проведен анализ применения метода оценки специфической (иммуногенной) активности современных вакцин клещевого энцефалита (вакцины КЭ) по протективному разведению (PR_{50}) и минимальной иммунизирующей дозе (MID_{50}). Метод стандартизован и внесен в нормативные документы на зарегистрированные в Российской Федерации вакцины КЭ. При анализе результатов изучения специфической (иммуногенной) активности вакцин КЭ (исследовано 107 серий вакцин КЭ различных производителей) подтверждены: выбор показателя реальной летальной дозы (RLD_{50}) вируса КЭ (тест-штамм «Абсеттаров») в пределах 100–3000 LD_{50} , целесообразность применения линейных мышей $VALB/c$, эффективность применения отечественного метода определения иммуногенности по показателю MID_{50} для вакцин КЭ, зарегистрированных в Российской Федерации. Подтверждена целесообразность применения стандартного образца иммуногенности вакцины КЭ – ОСО 42-28-48 для оценки сходимости результатов постановки экспериментов и однородности лабораторных животных по качеству. Метод определения иммуногенности вакцин КЭ (показатель качества «Специфическая активность (иммуногенность)» по показателям PR_{50} и MID_{50} применим как для российских коммерческих вакцин КЭ, так и для вакцины ФСМЕ-Иммун, производства компании «Бакстер вакцины АГ», Австрия.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцинопрофилактика; качество вакцин клещевого энцефалита; иммуногенность; специфическая активность; лабораторный контроль; сертификация; стандартизация; линейные мыши.

Библиографическое описание: Воробьева МС, Афонина ОС, Бархалева ОА, Щербинина МС, Саркисян КА, Рукавишников АВ, Шевцов ВА, Бондарев ВП. Анализ многолетнего опыта изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества – специфическая активность (иммуногенность). Биопрепараты 2015; (4): 4–10.

The analysis of the use of the method for the evaluation of specific (immunogenic) activity of vaccines for preventing tick-borne encephalitis (TBE vaccines) against protective dilution (PD_{50}) and the minimum immunizing dose (MID_{50}) has been performed. The method was standardized and submitted to the regulatory documents for TBE vaccines authorized in the Russian Federation. When analyzing the results of the study of specific (immunogenic) activity of TBE vaccines (107 TBE vaccine batches by different manufacturers have been studied) it was confirmed that the choice of real lethal

dose (RLD_{50}) indicator of TBE virus (test strain «Absettarov») in the range of 100–3000 LD_{50} , the reasonability of using BALB/c cell-line mice, the effectiveness of the national method of determining immunogenicity in terms of MID_{50} for TBE vaccines authorized in the Russian Federation. The reasonability of using immunogenicity reference standard for TBE-OSO 42-28–48 to assess the reproducibility of the experiments, and the homogeneity of laboratory animals in terms of quality. Methods for determining TBE vaccine immunogenicity («specific activity (immunogenicity)» in terms of PD_{50} and MID_{50}) is applicable both for Russian commercial TBE vaccines and for FSME-Immun vaccine, manufactured by «Baxter Vaccine AG», Austria.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccination; tick-borne encephalitis vaccine quality; immunogenicity; specific activity; laboratory testing; certification; standardization; linear mice.

Bibliographic description: Vorobieva MS, Afonina OS, Barhaleva OA, Shcherbinina MS, Sarkisyan KA, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA, Bondarev VP. The analysis of a long-term experience of studying inactivated cell-culture vaccines for preventing tick-borne encephalitis of domestic and foreign manufacture in terms of specific activity (immunogenicity). Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 4–10.

Гарантией качества вакцин является биологическая стандартизация, регламентирующая комплекс требований к иммунобиологическому лекарственному препарату на всех этапах производства, начиная с сырья, субстрата репродукции возбудителя и заканчивая методами контроля серий готового препарата. Качество вакцин клещевого энцефалита (КЭ) тесно связано с совершенствованием и унификацией технологии производства препаратов. Одним из основных показателей качества является специфическая активность (иммуногенность) препарата.

До 1984 г. для контроля защитных свойств неконцентрированной культуральной инактивированной вакцины КЭ использовали метод иммунизации мышей линии BALB/c испытываемой серией неразведенной вакцины КЭ с последующим заражением иммунизированных и мышей контрольной группы тест-штабмом вирулентного вируса КЭ и определением индекса резистентности (IR), представляющий собой разность показателей инфекционной активности вирулентного тест-штамма вируса КЭ при титровании на группах контрольных и иммунизированных испытываемой серией вакцины КЭ мышей. Метод применялся при контроле вакцин КЭ в ОБТК предприятий-производителей и в ГИСК им. Л.А. Тарасевича [1–3].

Совершенствование производства вакцин КЭ, оптимизация технологии культивирования вируса КЭ, современные методы концентрации и очистки вакцинного антигена потребовали разработки современных, более чувствительных методов испытания специфической (иммуногенной) активности препарата на животных.

В 1982–1984 годах с целью оценки активности концентрированной очищенной инактивированной культуральной вакцины КЭ на предприятии по производству бактериальных и вирусных препаратов института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова был разработан и аттестован метод определения иммуногенной активности по минимальной иммунизирующей дозе (MID_{50}). Метод основан на соблюдении ряда требований: использовании инбредных мышей BALB/c определенной весовой категории и возраста, иммунизации опытных групп животных различными разведениями испытываемой серии вакцины, приготовленными на одном и том же растворителе, с последующим проведением разрешения на иммунизированных мышках определенной дозы вирулентного тест-штамма вируса КЭ. Параллельно, в идентичных условиях, провели иммунизацию мышей линии BALB/c и все перечисленные выше процедуры постановки опыта для препарата сравнения – отраслевого стандартного образца вакцины КЭ – ОСО иммуногенности с регламентированными и стабильными показателями активности для

подтверждения правильности сходимости результатов постановки теста иммуногенной активности испытываемой серии вакцины [4, 5].

С 2001 г. метод определения иммуногенной активности на мышках BALB/c по MID_{50} с применением ОСО иммуногенности вакцины КЭ был использован для первичной аттестации в рамках доклинических испытаний и последующего контроля серий вакцины КЭ культуральной инактивированной концентрированной очищенной сорбированной «ЭнцеВир», разработанной и производимой в ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава РФ, в филиале НПО «Вирион», г. Томск.

Метод определения иммуногенной активности вакцин КЭ, с применением ОСО иммуногенности в качестве препарата сравнения, применяется до настоящего времени, регламентирован действующими нормативными документами (ФСП) на отечественные вакцины КЭ [7].

Схема иммунизации мышей, определение показателей RLD_{50} (реальная 50% летальная доза тест-штамма вируса КЭ) и PR_{50} (протективное разведение вакцины) сопоставимы с методом определения иммуногенности вакцин КЭ, изложенным в Европейской фармакопее [8]. Для отечественных вакцин КЭ, на основании показателя PR_{50} с учетом прививочной дозы вакцины дополнительно рассчитывается относительный показатель MID_{50} , предложенный профессором Л.Б. Эльбертом с соавт. в 1982 г. [6, 11]. Отечественный метод определения специфической активности вакцин КЭ имеет некоторые отличия от зарубежного: кратность разведений вакцины для иммунизации животных, характеристика линии инбредных мышей, метод учета и обработки результатов опыта, характеристика применяемого в эксперименте тест-штамма вируса КЭ.

За рубежом при оценке иммуногенности вакцин КЭ (ЭнцеПур, Германия; ФСМЕ-Иммун, Австрия), в качестве препаратов сравнения используют соответствующие референс-препараты. В сравнении с лиофилизированным образцом отечественного препарата сравнения – ОСО иммуногенности (срок годности 5 лет), зарубежные референс-препараты выпускаются в жидкой форме и имеют короткий срок годности. Лимит активности зарубежных вакцин рассчитывается с помощью пробит-анализа по коэффициенту протективности (отношение PR_{50} для серии вакцины КЭ к PR_{50} референс-препарата). Для зарубежных вакцин КЭ компании-производители указывают лимиты протективности – не менее 0,82 относительно референс-препарата (вакцина ЭнцеПур) и не менее 65% относительно референс-препарата (вакцина ФСМЕ-Иммун). Для вакцины ЭнцеПур показатели коэффициента протективности по результатам лабораторных исследований составляют

1,87–5,98; а для серий вакцины КЭ ФСМЕ-Иммун показатели активности составляют 69–102% и более по отношению к референс-препарату [10].

При регистрации зарубежных вакцин КЭ в Российской Федерации воспроизведение методов оценки иммуногенной активности этих препаратов (при отсутствии используемых иностранными компаниями вирулентных тест-штаммов вируса КЭ и референс-препаратов) было затруднительным и не обеспечивало возможность в доклиническом лабораторном испытании оценить и сопоставить активность зарубежных вакцин КЭ в сравнении с отечественными препаратами [2].

Целями данного исследования являлись:

- определение целесообразности, доступности и перспективности применения разработанного в России метода определения специфической (иммуногенной) активности вакцин КЭ по показателю $МИД_{50}$ для лабораторной оценки защитных свойств вакцин КЭ отечественного и зарубежного производства.
- определение преимущества использования линии инбредных мышей BALB/c для метода оценки иммуногенной активности вакцин КЭ;
- определение пригодности применения РЛД₅₀ (реальной 50% летальной дозы вируса КЭ тест-штамма при лимите, указанном в НД – 100–3500 ЛД₅₀).

Материалы и методы

Материалы

1. Животные

- инбредные мыши линий: СВА, масса тела 14–16 г;
- BALB/c, масса тела 14–16 г.

Животные поступали из Центрального питомника лабораторных животных РАМН. Рацион питания стандартный, с достаточным количеством воды.

2. Вакцины КЭ:

- серии вакцины КЭ культуральной инактивированной сорбированной жидкой (неконцентрированной) производства Томского НИИВС, прививочная доза 1,0 мл, поступавшие на контроль в ГИСК им. Л.А. Тарасевича в период с 1975 г. по 1983 г. (архивные материалы по результатам контроля 16 серий);

- серии вакцины КЭ культуральной инактивированной концентрированной очищенной сухой производства ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова, прививочная доза 0,5 мл, поступавшие на контроль в ГИСК им. Л.А. Тарасевича за период с 1992 г. по 2010 г. (архивные материалы по результатам контроля 24 серий);

- серии вакцины КЭ культуральной инактивированной концентрированной очищенной сорбированной Энцевир, производства ФГУП «НПО «Микроген», прививочная доза 0,5 мл, поступавшие на контроль с 2001 г. по 2010 г. (архивные материалы по результатам контроля 33 серий).

3. Серии стандартного образца вакцины: ОСО 42-28-48 соответствующего года выпуска.

4. Вирулентный штамм вируса КЭ «Абсеттаров» (европейский подтип), хранящийся в Государственной коллекции вирусов в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Методы

1. Оценка вакцин КЭ по показателю «Специфическая активность» по индексу резистентности (IR)

Мышей линии BALB/c иммунизировали серией вакцины КЭ (неконцентрированный препарат производства НПО «Вири-

он», г. Томск) двукратно, с интервалом 1 сут, внутрибрюшинно, дозой по 1,0 мл неразведенной вакцины. Одновременно формировали контрольную группу мышей BALB/c для последующего титрования вируса тест-штамма на иммунизированных мышах и животных контрольной группы. Разрешающий опыт титрования тест-штамма проводили через 7–8 сут после второй иммунизации мышей вакциной КЭ: суспензию вируса КЭ, тест-штамм «Абсеттаров» в объеме 0,25 мл вводили внутрибрюшинно в разведениях 10^{-2} – 10^{-7} иммунизированным мышам, и в разведениях 10^{-4} – 10^{-9} мышам контрольной группы, по 6 особей на каждое разведение. Наблюдение за животными после введения вируса КЭ проводили в течение 14 сут с ежедневным учетом количества выживших и заболевших (павших) мышей. Титры вируса тест-штамма «Абсеттаров» в Ig ЛД₅₀/мл определяли по методу Рида и Менча [9].

2. Определение иммуногенной активности вакцин КЭ по показателю $МИД_{50}$

Мышей линии BALB/c или СВА трехкратно иммунизировали подкожно разведениями вакцины (1:10, 1:32, 1:100, 1:320) в дозе 0,5 мл, с интервалами 1–2 сут, с последующим внутрибрюшинным введением через 7–9 сут после последней иммунизации вирулентного вируса КЭ (тест-штамма «Абсеттаров») в расчетной дозе вируса 100–3500 ЛД₅₀ в объеме 0,25 мл при титре вируса не менее 8,5 Ig ЛД₅₀/мл. Животных наблюдали в течение 14 сут. По количеству выживших и заболевших (павших) мышей с помощью метода Рида и Менча рассчитывали три показателя:

- РЛД₅₀ (реальная летальная доза вируса тест-штамма, введенная внутрибрюшинно иммунизированным вакциной КЭ мышам);

- ПР₅₀ (протективное разведение вакцины, обеспечивающее защиту 50% иммунизированных мышей от заражения вирулентным тест-штаммом вируса КЭ в дозе, равной РЛД₅₀);

- $МИД_{50}$ (относительный показатель) – минимальное иммунизирующее количество (в мл) вакцины КЭ, которое защищает иммунизированных испытуемой вакциной КЭ мышей от заражения реальной летальной дозой вируса КЭ (РЛД₅₀).

3. Статистические методы

Определение суммарных средних показателей ($M \pm m$) для РЛД₅₀, ПР₅₀ и $МИД_{50}$ проводили на основании значений этих показателей для каждой исследованной серии (n) вакцин КЭ при использовании компьютерной программы расчета Microsoft Office Excel: M (среднеарифметическое значение определяемого показателя) и m (стандартное отклонение) [12].

Результаты и обсуждение

1. Сравнение методов оценки иммуногенной активности вакцин КЭ

Оценку иммуногенной активности вакцин КЭ проводили двумя методами: определения IR и $МИД_{50}$ для 6 серий неконцентрированной вакцины КЭ и двух вариантов (по 5 серий) концентрированной очищенной вакцины КЭ, результаты представлены в таблице 1.

Метод определения значения индексов резистентности (IR): установлены близкие (средние) IR: от 6,0 до 7,8 независимо от технологии производства испытуемых серий вакцин КЭ.

Метод определения $МИД_{50}$: выявлено различие в показателях $МИД_{50}$ – средний показатель $МИД_{50}$ для концентрированной вакцины КЭ был меньше (в 2–4 раза по отношению к

Таблица 1. Сравнительный анализ иммуногенной активности по IR и МИД₅₀ серий вакцин КЭ разной технологии при оценке с применением двух методов определения (IR и МИД₅₀)

Вакцина КЭ/ количество серий (n) *	Средний показатель индекса резистентности (IR)	P**	Средний показатель иммуногенности по МИД ₅₀	P**
Неконцентрированная культуральная инактивированная сорбированная вакцина КЭ (штамм «Софьин») n* = 6	7,61±0,5	>0,1	0,022±0,006	<0,001
Концентрированная очищенная культуральная инактивированная сухая вакцина КЭ (штамм «Софьин»), вариант технологии очистки и концентрации вакцинного антигена: ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы – n* = 5	7,88±0,46	>0,1	0,005±0,002	-
Концентрированная очищенная культуральная инактивированная сухая вакцина КЭ (штамм «Софьин»), вариант технологии очистки и концентрации вакцинного антигена: адсорбционная хроматография с гель-фильтрацией – n* = 5.	6,0±0,5	-	0,008±0,001	-

Примечание. n* – количество исследованных серий вакцин; P** – критерий P, характеризующий достоверность различия (по таблице Стьюдента–Фишера) между средними геометрическими величинами M ± m [12].

Таблица 2. Иммуногенная активность по методу МИД₅₀ концентрированной вакцины КЭ (штамм «Софьин») при сравнительном исследовании на мышах линии BALB/c и линии СВА

Линия мышей	Показатели МИД ₅₀ /0,5 мл для 6 серий концентрированной вакцины КЭ производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР						M±m	P**
	0,0089	0,012	0,01	0,0078	0,0070	0,0078		
BALB/c	0,0089	0,012	0,01	0,0078	0,0070	0,0078	0,0086±0,00084	<0,01
СВА	0,021	0,02	0,03	0,016	0,009	0,015	0,016±0,0023	

Примечание. P** – см. примечание к таблице 1.

лимиту МИД₅₀). Для неконцентрированной вакцины КЭ – показатель МИД₅₀ составил от 0,016 до 0,028 мл (с учетом значения «m») и превышал значение лимита иммуногенной активности.

Метод МИД₅₀ дифференцирует по активности вакцины КЭ различной технологии и подтверждает более высокую иммуногенную активность отечественной концентрированной очищенной вакцины КЭ в сравнении с ранее выпускавшейся неконцентрированной вакциной КЭ.

На основании проведенного анализа была подтверждена более высокая чувствительность метода определения специфической активности (иммуногенности) вакцин КЭ по показателю МИД₅₀ в сравнении с методом определения IR.

2. Анализ результатов исследования активности вакцин КЭ на двух линиях инбредных мышей

Представлены результаты оценки показателей МИД₅₀ для 6 серий концентрированной вакцины КЭ при использовании для иммунизации двух различных линий мышей – СВА и BALB/c. Животные не различались по массе тела, возрасту, были аналогичными и другие условия экспериментов – использовали равнозначную стандартную регламентированную нормативной документацией на вакцину КЭ методику определения показателя «Специфической активности» по МИД₅₀ (табл. 2).

Согласно данным, представленным в таблице 2, при анализе значений МИД₅₀ для каждой серии, средних значений и среднего отклонения (M±m) МИД₅₀ было установлено преимущество линии мышей BALB/c. Значения МИД₅₀ для серий концентрированной вакцины КЭ при испытании на мышах линии BALB/c – **0,0078–0,0094 мл были меньше по сравнению с результатами оценки МИД₅₀ на мышах линии СВА – 0,014–0,018 мл**, т.е. минимальная доза вакцины для мышей BALB/c, необходимая для создания защиты от вируса КЭ в пересчете на введенную дозу вакцины (0,5 мл), в 2 раза меньше, чем минимальная доза вакцины КЭ для мышей СВА. В настоящее время применение более чувствительной

и иммунологически более реактивной линии мышей BALB/c включено в общую фармакопейную статью (ФСП) на отечественные вакцины КЭ для определения иммуногенной активности вакцин КЭ [7].

3. Анализ результатов испытаний специфической активности серий вакцин КЭ отечественного и зарубежного производства с применением показателя МИД₅₀, с определением пригодности применения РЛД₅₀

Проведен анализ иммуногенной активности (по средним значениям показателей ПР₅₀ и МИД₅₀) 57 серий двух отечественных концентрированных очищенных культуральных инактивированных вакцин КЭ. Значения МИД₅₀ для каждой испытываемой серии вакцин КЭ были распределены в зависимости от величины РЛД₅₀ вируса тест-штамма «Абсеттаров» (в пределах от 100–3500 ЛД₅₀). Правильность постановки экспериментов и достоверность полученных результатов подтверждались параллельной оценкой иммуногенности ОСО вакцины КЭ (табл. 3).

Показано, что средние значения реальной летальной дозы вируса тест-штамма по отношению к расчетной летальной дозе (от 100 ЛД₅₀ до 1000 ЛД₅₀) составляют (с учетом стандартного отклонения «m»): 484,5 ЛД₅₀/486,25 ЛД₅₀ – 2456,2 ЛД₅₀/2321,3 ЛД₅₀. Установлены средние значения («M») для ПР₅₀ и МИД₅₀ по 33 сериям вакцин КЭ Энцевир и по 24 сериям вакцин КЭ ПИПВЭ-Москва. Показано отсутствие зависимости этих показателей активности от величины реальной летальной дозы вируса КЭ, тест-штамм «Абсеттаров», введенной иммунизированным мышам: значения «m»: для вакцины КЭ Энцевир МИД₅₀ – 0,006/0,010–0,004/0,005 мл, а для вакцины КЭ ПИПВЭ-Москва – от 0,004/0,005 до 0,005/0,007 мл при значении лимита иммуногенности по ФСП = 0,0125 и показателях МИД₅₀ для ОСО иммуногенности: 0,004/0,006–0,002/0,004 мл соответственно. Проведенный анализ показал, что значения РЛД₅₀ допустимы в пределах от 100 до 3500 ЛД₅₀, современные отечественные вакцины КЭ обладают значительным запасом иммуногенной активности по МИД₅₀ на мышах линии BALB/c.

Таблица 3. Иммуногенная активность вакцин КЭ культуральных инактивированных концентрированных очищенных: лиофилизированной вакцины производства «ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, сорбированной Энцевир производства ФГУП «НПО «Микроген», г. Томск

Средние показатели иммуногенности (M ± m)			ОСО иммуногенности России (M ± m)	
Название вакцины/ количество серий				
РЛД ₅₀	ПР ₅₀	МИД ₅₀	ПР ₅₀	МИД ₅₀
ЭнцеВир / 19 серий				
484,5 ± 248,6	1: 64,4 ± 13,3	0,008±0,0021	1:154,4 ± 11,1	0,007 ± 0,001
ЭнцеВир / 14 серий				
2456,2 ± 476,7	1:157,4 ± 26,1	0,0041±0,0006	1:167,4 ± 38,1	0,004 ± 0,0007
ПИПВЭ-Москва / 18 серий				
486,25 ± 212,4	1:159,6 ± 31,1	0,004±0,0005	1:100,7 ± 18,4	0,005 ± 0,0008
ПИПВЭ-Москва / 6 серий				
2321,3 ± 208,7	1:90,9 ± 15,7	0,006±0,0009	1:170,9 ± 55,1	0,003 ± 0,001

Таблица 4. Иммуногенная активность вакцин КЭ культуральных инактивированных концентрированных очищенных сорбированных: ФСМЕ-Иммун компания «Бакстер вакцины АГ», Австрия и Энцепур взрослый, компания «Новартис вакцины АГ», Германия

Средние показатели иммуногенности (M ± m)			ОСО иммуногенности России (M ± m)	
Название вакцины/ количество серий				
РЛД ₅₀	ПР ₅₀	МИД ₅₀	ПР ₅₀	МИД ₅₀
ФСМЕ-Иммун /10 серий				
625±338,7	1:172,2±29,3	0,003±0,0005	1:260,7±94,6	0,004±0,001
ФСМЕ-Иммун / 4 серии				
3203,5±723,3	1:151,1±28,5	0,002±0,0009	1:224,4±135,2	0,002±0,001
Энцепур взрослый / 4 серии				
758,3±407,8	1:118,1±118,5	0,02 ±0,01	1:248,6± 116,5	0,003± 0,002
Энцепур взрослый / 10 серий				
2085,03±582,5	1:26,7 ±4,5	0,022 ±0,004	1:234,08±54,7	0,002± 0,0004

Таким образом, анализ многолетнего опыта применения метода расчета иммуногенной активности серий вакцин КЭ по МИД₅₀ подтвердил возможность стандартного определения активности вакцин КЭ как по каждой серии, так и по средним показателям. Параллельное применение стандартного образца – ОСО иммуногенности вакцин КЭ в опытах на мышах **VALB/с подтверждает правильность и сходимост** полученных результатов.

Проведены сравнительные исследования оценки иммуногенной активности с применением российского метода определения по МИД₅₀ в рамках регистрации в Российской Федерации вакцины ФСМЕ-Иммун, Австрия. В ранее опубликованных нами предварительных испытаниях (до регистрации препарата в России), были использованы в сравнительном тесте по три серии вакцин КЭ австрийского и отечественного производства. Исследования по оценке иммуногенности проводились на мышах линии VALB/с и линии Swiss при применении следующей схемы иммунизации мышей: двукратно, подкожно, животные были иммунизированы дозами вакцины КЭ в разведениях от 1:5 до 1:125 в объеме по 0,2 мл, с последующим разрешением вирулентными тест-штаммами вируса КЭ: «Абсеттаров», «Нург» (европейский подтип) и штаммами № 205, № 139 (дальневосточный подтип) в дозах от 100 ЛД₅₀ до 3000 ЛД₅₀. Не было выявлено статистически значимых различий в показателях иммуногенности (по ПР₅₀) для обеих вакцин КЭ при инфицировании иммунизированных животных различными штаммами вируса КЭ, принадлежащими к

различным подтипам вируса во всех использованных дозах вируса [13, 14]. Проведенные предварительные сравнительные исследования вакцин КЭ с применением различных тест-штаммов, в том числе и тест-штамма «Абсеттаров», в дозе от 100 до 3000 ЛД₅₀ и различных линий мышей подтвердили возможность применения регламентированного отечественного метода определения активности для вакцины ФСМЕ-Иммун.

Как видно из данных, представленных в таблице 4, для вакцины КЭ ФСМЕ-Иммун были выявлены те же закономерности при оценке показателей ПР₅₀ и МИД₅₀ (по средним значениям оценки активности 14 серий вакцины) с параллельной постановкой российского ОСО иммуногенности, значения ПР₅₀ и МИД₅₀ не зависели от величины реальной летальной дозы вируса (штамм «Абсеттаров»).

МИД₅₀ (средние значения) для вакцины КЭ ФСМЕ-Иммун составляла, с учетом значения стандартного отклонения «m», 0,0035–0,0029 мл, при этом для ОСО этот показатель составил 0,003–0,005 мл, при лимите иммуногенности 0,0125 мл.

Таким образом, значения ПР₅₀ и МИД₅₀ для вакцины КЭ ФСМЕ-Иммун, Австрия и ОСО соответствовали российским требованиям по показателю «Специфическая активность» (иммуногенность). Отечественный метод определения иммуногенной активности вакцин КЭ оказался пригоден для аттестации вакцины КЭ ФСМЕ-Иммун, Австрия. При регистрации препарата в Российской Федерации данный метод был внесен в нормативную документацию на вакцину ФСМЕ-Иммун и

до настоящего времени применяется для сертификации серий этого препарата.

Также в таблице 4 представлены результаты анализа иммуногенной активности вакцины КЭ Энцепур взрослый, Германия. Данный препарат в настоящее время в своем составе не содержит альбумина крови человека или других белковых стабилизаторов активности вакцины КЭ. Анализ результатов по определению возможности использования для вакцины КЭ Энцепур взрослый отечественной методики оценки иммуногенной активности по МИД₅₀ показал, что при значениях РЛД₅₀ 758,3–2085,03 ЛД₅₀ (т.е. в пределах 100–3500 ЛД₅₀) были выявлены более низкие значения ПР₅₀ – от 1:118 до 1:26,7; среднее значение МИД₅₀ для вакцины Энцепур взрослый было, независимо от дозы РЛД₅₀, 0,02–0,22 мл, т.е. более допустимого лимита МИД₅₀ – 0,0125 мл.

Выводы

Отечественный метод определения иммуногенной активности вакцин КЭ – МИД₅₀ обладает достаточной чувствительностью и позволяет проводить сравнение между препаратами, изготовленными по различным технологиям, как отечественных, так и зарубежных производителей.

Доказано преимущество использования для метода оценки иммуногенной активности вакцин КЭ линии инбредных мышей BALB/c.

Определена пригодность применения реальной 50% летальной дозы вируса КЭ тест-штамма «Абсеттаров» (РЛД₅₀) при ее содержании в пределах 100–3500 ЛД₅₀.

Авторы выражают благодарность Марине Николаевне Расщепкиной за непосредственное участие в работе.

Литература:

1. Дзагуров СГ, Быченко БД. Биологическая стандартизация. Вопросы вирусологии 1984; (3): 264–70.
2. Воробьева МС. Принципы стандартизации и совершенствование методов контроля вакцин клещевого энцефалита: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1985.
3. Воробьева МС. Вакцины для специфической профилактики клещевого энцефалита. Деинфекционное дело 2007; (1): 45–7.
4. Расщепкина МН. Разработка и изучение стандартного образца для оценки иммуногенной активности вакцины клещевого энцефалита. В сб.: Стандарты, штаммы, и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. М.; 1982. С. 154–8.
5. Воробьева МС, Меркулов ВА, Ладыженская ИП, Руквишников АВ, Шевцов ВА. История создания и оценки качества современных вакцин КЭ отечественного и зарубежного производства. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (3): 40–4.
6. Эльберт ЛБ, Ворович МФ, Тимофеев АВ. Сравнительный анализ *in vitro* и *in vivo* количественной оценки иммуногенности вакцин клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии 1998; (5): 235–8.
7. Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная жидкая или сухая с в комплексе с растворителем – алюминия гидроксидом. Фармакопейная статья. Государственный стандарт качества лекарственного средства. Available from: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-departamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey>.
8. Красильников ИВ. Вакцины против клещевого энцефалита, бешенства и гепатита В. Разработка высокоэффективной технологии получения препаратов, иммунобиологические и клинические испытания: дис. ... д-ра биол. наук. М.; 1998.
9. Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Amer J Hyg. 1938; 27: 493.
10. Kunz Ch, Heinz F, Hofmann H. Immunogenicity and reactivity of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis. Med Virol. 1980; 2: 103–9.
11. Эльберт ЛБ, Гагарина АВ, Ханина МК. Концентрированная очищенная вакцина против клещевого энцефалита, приготовленная методом зонального центрифугирования. Разработка препарата. Вопросы вирусологии 1980; (3): 341.
12. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М.; 1962.
13. Воробьева МС, Расщепкина МН, Ладыженская ИП, Горбунов МА, Павлова ЛИ, Бектимиров ТА. Сравнительное изучение инактивированных культуральных вакцин против клещевого энцефалита отечественного производства и производства фирмы «Иммун» (Австрия). Вопросы вирусологии 1996; 41(5): 221–4.
14. Holzmann H, Vorobyova MS, Ladeshenskaya IP, Ferenzi E, Kundi M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. Vaccine 1992, 10: 345–9.

References

1. Dzagurov SG, Bychenko BD. Biological Standardization. Voprosy virusologii 1984; (3): 264–70 (in Russian).
2. Vorobieva MS. The principles of standardization and improvement of methods for control of tick-borne encephalitis vaccine. Dr.Med.Sci [dissertation]. Moscow; 1985 (in Russian).
3. Vorobieva MS. Vaccines for the prevention of specific tick-borne encephalitis. Dezinfectionsionnoe delo 2007; (1): 45–7 (in Russian).
4. Rasschepkina MN. The development and study of a standard sample to evaluate immunogenicity vaccine encephalitis. In: Standards, strains and control methods for bacterial and viral preparations. Moscow; 1982. P. 154–8 (in Russian).
5. Vorobieva MS, Merkulov VA Ladyzhenskaya IP, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA. History and assess of the quality of modern vaccines KE of domestic and foreign production. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2013; (3): 40–4 (in Russian).
6. Elbert LB, Vorovich MF, Timofeev AV. Comparative analysis of the quantitative evaluation of the immunogenicity of encephalitis vaccines *in vitro* and *in vivo*. Voprosy virusologii 1998; (5): 235–8 (in Russian).
7. Tick-borne encephalitis vaccine culture purified inactivated adsorbed concentrated liquid or dry with together with the solvent – aluminum hydroxide. Pharmacopeial article. State quality standard of medicine. Available from: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-departamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey> (in Russian).
8. Krasilnikov IV. The vaccines against tick-borne encephalitis, rabies and hepatitis B. The development of technology for high-performance products, immunobiological and clinical trials. Dr.Biol.Sci [dissertation]. Moscow; 1998 (in Russian).
9. Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Amer J Hyg. 1938; 27: 493.
10. Kunz Ch, Heinz F, Hofmann H. Immunogenicity and reactivity of a highly purified vaccine against tick-borne encephalitis. Med Virol. 1980; 2: 103–9.
11. Elbert LB, Gagarina AB, Hanina MK. The concentrated purified vaccine against tick-borne encephalitis, prepared by zonal centrifugation. Development of the drug. Voprosy virusologii 1980; (3): 341 (in Russian).
12. Ashmarin IP, Vorobiev AA. Statistical methods in microbiological studies. Moscow; 1962 (in Russian).
13. Vorobieva MS, Rasschepkina MN, Ladyzhenskaya IP, Gorbunov MA, Pavlova LI, Bektimirov TA. A comparative study of cultural inactivated vaccine against tick-borne encephalitis, domestic production and production of company "Immuno" (Austria). Voprosy virusologii 1996; 41(5): 221–4 (in Russian).
14. Holzmann H, Vorobyova MS, Ladeshenskaya IP, Ferenzi E, Kundi M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. Vaccine 1992, 10: 345–9.

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Vorobieva MS. Chief expert of Office of expertise of antiviral medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Afonina OS. Microbiologist of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Barhaleva OA. Leading expert of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Shcherbinina MS. 2nd category expert of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Sarkisyan KA. Head of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Rukavishnikov AV. Deputy head of Office of expertise of antiviral medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Shevtsov VA. Head of Office of expertise of antiviral medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Воробьева Мая Сергеевна. Главный эксперт Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Афонина Ольга Сергеевна. Микробиолог Лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Бархалева Оксана Александровна. Ведущий эксперт Лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Щербинина Мария Сергеевна. Эксперт 2-й категории Лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Саркисян Каринэ Артасесовна. Начальник Лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Шевцов Владимир Александрович. Начальник Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Воробьева Мая Сергеевна; Vorobiova@expmed.ru

Поступила 30.07.2015 г.

Принята 06.11.2015 г.