МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»

На правах рукописи

СИНЮГИНА
Александра Александровна

ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

(исследования безопасности и иммуногенности)

03.02.02 – Вирусология

Диссертация
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Ишмухаметов А. А.

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ стр

ВВЕДЕНИЕ…… 4

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ……. 10

Глава 1 Хантавирусные вакцины (обзор литературы)…… 10

1.1 Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (краткая справка)…. 10

1.2 Инактивированные хантавирусные вакцины на основе субстратов ткани головного мозга лабораторных животных…… 13

1.3 Инактивированные хантавирусные вакцины на основе клеточных культур 18

1.4 Рекомбинантные и ДНК-овые хантавирусные вакцины…… 21

1.5 Заключение……. 24

Глава 2 Материалы и методы…….. 26

2.1 Экспериментальные серии поливалентной вакцины…… 26

2.1.1 Культура клеток……. 26

2.1.2 Вирусы……. 26

2.1.3 Лабораторные животные …… 29

2.1.4 Методы контроля, регламентируемые Государственной Фармакопеей …. 31

2.1.5 Специфические методы, разработанные для контроля хантавирусных вакцин 31

2.1.6 Исследования острой токсичности ..…… 38

2.1.7 Исследование хронической токсичности……. 40

2.1.8 Исследование аллергизирующих свойств…… 42

2.1.9 Исследование иммунотоксических свойств……. 44

2.1.10 Исследование эмбриотоксического действия……...…….. 45

2.1.11 Исследование влияния на репродуктивную функцию…… 48

2.1.12 Исследование мутагенных свойств в тесте Эймса…….. 49

2.1.13 Исследование иммуногенности и стабильности……. 49

2.1.14 Методы статистической обработки результатов исследований …… 50

Глава 3 Основные технологические этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак…… 51

3.1 Производство и методы контроля ……... 51

3.1.1 Накопление вируссодержащего материала ……..... 53

3.1.2 Концентрирование вируссодержащей культуральной жидкости …… 53

3.1.3 Очистка первичных концентратов вирусов …… 53

3.1.4 Инактивирование и контроль на отсутствие живого вируса (специфическая безопасность) моновалентных вакцин против ГЛПС ….. 54

3.1.5 Получение готовой формы вакцины ГЛПС-Вак …….. 54

Глава 4 Результаты токсикологических исследований вакцины ГЛПС-Вак……..... 59

4.1 Исследование острой токсичности вакцины ……. 59
4.2 Исследование хронической токсичности …… 73
4.3 Исследование аллергизирующих свойств …….. 88
4.4 Исследование иммунотоксичности ……..... 91
4.5 Исследование эмбриотоксического действия……. 94
4.6 Исследование влияния на репродуктивную функцию животных …… 99
4.7 Исследование мутагенных свойств в тесте Эймса…….. 102
Глава 5 Результаты исследования иммуногенности и стабильности вакцины ГЛПС-Вак ……... 106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…… 112
ВЫВОДЫ…….……. 115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ …….…..……. 116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ …….……... 117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространенный в Евразии, а в России занимающий первое место по заболеваемости среди природно-очаговых инфекций.

Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, расширение ареала инфекции, участившиеся случаи вспышек ГЛПС, ассоциированных с новыми, ранее не известными в России хантавирусами, свидетельствует о возрастающей медицинской и социальной значимости проблемы ГЛПС [1].

По данным Роспотребнадзора только за период с 2000 по 2019 гг. в России было зарегистрировано 152 588 случаев заболевания ГЛПС, включая более 3,5 тысяч детей в возрасте до 14 лет. Более 600 случаев заболевания закончились летальным исходом. Социально-экономические потери усугубляются ещё и тем, что из числа заболевших ГЛПС до 85% составляют мужчины в возрасте от 20 до 50 лет, то есть, самая трудоспособная часть населения. Этиотропное лечение заболевания отсутствует. Из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация. Вместе с тем, дератизационные мероприятия обходятся довольно дорого, обеспечивают лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и не могут решить проблему полной ликвидации природного резервуара возбудителя ГЛПС. 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 Хантаан и Сеул, не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей Европейской части России, на которую приходится более 98% всей заболеваемости, регистрируемой в России [2].

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 [3].

Накопленный в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» опыт по изучению вирусов-возбудителей ГЛПС позволил впервые в мире разработать технологию изготовления и методы контроля поливалентной культуральной, инактивированной,

концентрированной, очищенной вакцины против основных возбудителей ГЛПС, вызывающих заболевание людей в европейских и дальневосточных регионах России.

Успешное внедрение в практику здравоохранения новой вакцины против ГЛПС возможно лишь при наличии доказанной в соответствии с современными требованиями высокой степени эффективности и безопасности её применения. Первым этапом исследований в этом направлении является проведение доклинических испытаний вакцины, что наряду с оптимизацией технологии изготовления вакцины явилось предметом настоящей работы [2].

Степень разработанности темы исследования

Вскоре после выделения возбудителей ГЛПС, вирусов Хантаан и Сеул, инактивированные вакцины активно начали разрабатываться в Южной и Северной Корее, Китае, Японии [4, 5, 6, 7]. Часть этих разработок были внедрены в производство. Так в Южной Корее с 1990 года выпускается лицензированная моновалентная вакцина Hantavax® [4]. В Китае несколько различных мозговых и культуральных вакцин на основе вирусов ХТН и СЕУ, инактивированных формалином или β-пропиолактон (β-ПЛ) было произведено и использовано для массовой иммунизации населения [8, 9]. Вакцинация, в дополнение к другим профилактическим мерам, снизила количество случаев ГЛПС в этих регионах [10]. Однако до настоящего времени ни одна из вакцин против ГЛПС не была одобрена для применения в Европе и США [11]. Для профилактики ГЛПС, вызываемой, циркулирующими на Европейской территории вирусами Пуумала и Добрава/Белград активно разрабатывались экспериментальные векторные и ДНК-вакцины [11], но ни одна из них не дошла до стадии производства.

В России были разработаны лабораторные технологии производства экспериментальных инактивированных формалином вакцин на основе размноженных в культуре клеток VERO вирусов, сорбированных на гидроокиси алюминия: двухкомпонентная вакцина (вирусы Пуумала и Куркино) [12, 13], моновалентная на основе вируса Пуумала [3], вызывающего более 95% всех случаев ГЛПС в РФ. Доклинические лабораторные испытания этих вакцинных препаратов показали их высокую иммуногенность и безопасность [13]. Технологические подходы, использованные при разработке экспериментаьных моно и бивалентной вакцин, легли в основу конструирования поливалентной (трёхвалентной) вакцины, актуальность которой объясняется наличием очагов хантавирусной инфекции ассоциированной на Европейской территории с ортохантавирусами Пуумала и Добрава/Белград (вирус Сочи) и с

ортохантавирусом Хантаан на Дальнем Востоке. В исследовании впервые представлены данные доклинических испытаний экспериментальной поливалентной вакцины против ГЛПС.

Цель исследования – получение доказательств безопасности и специфической эффективности поливалентной вакцины против ГЛПС (на основе 3-х хантавирусов) в результате проведения доклинических исследований с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики (GLP).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать применительно к технологии изготовления вакцины против ГЛПС комплекс методов (in vivo и in vitro) для проведения доклинических исследований на соответствие вакцины требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.
2. Приготовить опытные образцы (3 лабораторные серии) вакцины против ГЛПС в количестве, достаточном для проведения доклинических исследований.
3. Провести экспериментальные исследования по изучению иммуногенной активности и стабильности вакцины против ГЛПС.
4. Провести испытания общей токсичности (острой, хронической), аллергизирующих свойств, иммунотоксичности, мутагенности, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности вакцины против ГЛПС на животных.
5. Разработать соответствующие нормативно-технические документы по изготовлению вакцины против ГЛПС и протоколы её доклинических исследований.

Научная новизна

Впервые в результате экспериментальных исследований удалось научно обосновать биотехнологические подходы для создания и доклинических исследований инактивированной кандидатной поливалентной (на основе трех хантавирусов) вакцины против ГЛПС, не имеющей аналогов в мире. Впервые показано, что трехвалентная кандидатная вакцина в равной степени индуцирует иммунный ответ по отношению к составляющим её вирусам – возбудителям ГЛПС. Впервые проведены токсикологические исследования на трех видах животных, показавшие отсутствие токсичности (острой, хронической), аллергизирующих свойств, иммунотоксичности, мутагенности, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности поливалентной вакцины.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработана технология изготовления поливалентной кандидатной вакцины против ГЛПС, адаптированной к эпидемиологическим условиям РФ, то есть, с использованием наиболее патогенных и эпидемиологически значимых хантавирусных штаммов. Все методические подходы, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы для освоения промышленного производства вакцины ГЛПС-Вак. Универсальность вакцины позволяет рассматривать её в качестве наиболее перспективного вакцинного препарата для специфической профилактики ГЛПС как в России, так и в других европейских и азиатских странах.
2. Разработаны соответствующие нормативно-технические документы, включая проекты опытно-промышленного регламента, фармакопейной статьи предприятия, инструкции по применению вакцины, брошюры исследователя и протокола клинического исследования.
3. Результаты проведения комплексного доклинического испытания вакцины ГЛПС-Вак с применением научных методов оценок, соответствующих требованиям и правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) могут являться основанием для проведения I-й фазы клинических испытаний.
4. Получен патент на изобретение за № 2683508 от 28.03.2019 г. «Штамм вируса для изготовления вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (варианты)». В Евразийское патентное ведомство подана заявка о выдаче патента на изобретение: «Технология получения вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом». Зарегистрирована 10.10.2018 г. под № 201800511.

Методология и методы исследования

В исследованиях, проведенных в рамках настоящей диссертационной работы, применяли комплекс современных лабораторных методов (включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические).

Объем доклинических исследований определяли в соответствии с нормативно-регламентирующими документами [14 - 20].

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимизированы биотехнологические этапы производства изготовления трёхвалентной вакцины против ГЛПС и разработан комплекс методов (in vivo и in vitro) для проведения доклинических исследований на соответствие вакцины

требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям.

2. Приготовлены 3 лабораторные серии вакцины в количестве, достаточном для проведения доклинических исследований.
3. Состояние животных в экспериментах по определению острой и хронической (субхронической) токсичности свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности вакцины в дозах, значительно превышающих вакцинирующие дозы для человека.
4. Показано отсутствие иммунотоксического влияния вакцины на В-клеточный и Т-клеточный иммунитет в экспериментах по определению титра гемагглютинина в сыворотке крови мышей и в реакции гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана на фоне иммунизации эритроцитами барана.
5. Установлено отсутствие проявлений аллергизации, вызванных введением вакцины в экспериментах на половозрелых и неполовозрелых морских свинках.
6. Вакцина не нарушает репродуктивную функцию экспериментальных животных и не оказывает эмбриотоксического воздействия при длительном введении самцам и самкам крыс.
7. Вакцина не проявляет мутагенных свойств по результатам проведения теста Эймса.
8. Вакцина против ГЛПС полностью соответствует проекту спецификации по контролируемым параметрам через 2 года 8 мес хранения в регламентируемых условиях.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненных с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Личное участие автора

Личный вклад автора заключается в планировании и организации проведения исследований по разделам диссертации, подготовке основных публикаций, формулировании выводов и основных положений диссертации. Имена всех соавторов указаны в опубликованных

работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Автор являлся исполнителем гранта №2018-14.N08.11.0102-3-001 Государственного контракта на тему: «Доклинические исследования поливалентной инактивированной вакцины против хантавирусных лихорадок на основе не менее трёх хантавирусов – возбудителей», в рамках которого выполнены разделы, касающиеся доклинических исследований вакцины против ГЛПС.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019), Региональной научно-практической конференции Приволжского федерального округа «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: эпидемиология, профилактика и диагностика на современном этапе» (Казань, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы (Москва, 2019), 11-й международной конференции по хантавирусам (Лёвен, Бельгия, 2019), Ежегодном конгрессе международного вакцинного общества (Гент, Бельгия, 2019).

Публикации

Основные результаты работы полностью отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них в журналах ВАК – 5; публикации, индексируемые в системе Web of Science - 2 статьи; индексируемые в системе РИНЦ - 12, включая 5 тезисов; тезисы, опубликованные за рубежом – 3. По теме дисертации получен 1 патент на изобретение.

Структура и объём диссертации.

Диссертационная работа изложена на 125 страницах и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, основные технологические этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак, результаты доклинических исследований вакцины ГЛПС-Вак, а также заключение, выводы, список сокращений, список литературы, содержащий 105 источников. Работа иллюстрирована 84 таблицами и 4 рисунками.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1 Хантавирусные вакцины (обзор литературы)

1.1 Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (краткая справка)

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), впервые выявленная на территории Евразии более 80 лет тому назад, вместе с другой этиологически сходной инфекцией - Хантавирусный пульмональный синдром (ХПС), впервые обнаруженной в 1993 году и широко распространённой в настоящее время в странах Северной и Южной Америки, составляют группу, так называемых хантавирусных лихорадок [21].

Хантавирусные лихорадки представляют собой природноочаговые нетрансмиссивные зоонозы, вирусы-возбудители которых объединены в составе рода *Orthohantavirus* в семейство *Hantaviridae* отряда *Bunyavirales* современной таксономической классификации вирусов [22]. Отсюда и терминология возбудителей – “хантавирусы” и групповое название нозологических форм – “хантавирусные лихорадки”.

Географическое распространение хантавирусов лимитируется распространенностью их хозяев, и поскольку грызуны и насекомоядные распространены убиквитарно, хантавирусы можно обнаружить повсюду в мире, за исключением, возможно, Антарктики, части Гренландии и Океании. Вопрос о реальном количестве существующих в природе хантавирусов остается открытым, как и вопрос об эпидемиологической опасности еще не выявленных к настоящему времени видов, их природных резервуарах и носителях [23].

Возбудителями ГЛПС являются вирусы Хантаан, Сеул, Пуумала, Амур и 4 геноварианта вируса Добрава/Белград (Добрава, Куркино, Сочи, Саарема). ХПС вызывают, главным образом, вирус Син-Номбре в странах Северной Америки и вирус Андес - в странах Южной Америки).

Все хантавирусы имеют сходную организацию - округлую форму с размером в диаметре от 90 до 130 нм. Липидосодержащая оболочка имеет выступы, сформированные вирионными гликопротеинами G1 и G2 [23]. Хантавирусы содержат одноцепочечный сегментированный РНК геном отрицательной полярности, включающий 3 сегмента. Большой сегмент генома (L) кодирует вирусную РНК-зависимую РНК полимеразу, средний (M) - поверхностные гликопротеины G1 и G2, малый сегмент (S) - нуклеокапсидный белок NP. Нуклеокапсидный белок ответственен за продукцию антител, обладающих высокой межвидовой кросс-реактивностью, а также является индуктором Т-клеточного иммунитета. Поверхностные белки гликопротеина индуцируют образование нейтрализующих, а также гемагглютинирующих антител, высокоспецифичных для

каждого отдельного вида хантавирусов. Для видовой дифференциации хантавирусов используется анализ генетического и эволюционного родства, проводимый с помощью математической обработки данных (филогенетический анализ) по нуклеотидным последовательностям вирусного генома [21].

Прикрепление и внедрение хантавирусов в клетки осуществляется путем взаимодействия вирусных эпитопов с интегринами - клеточными рецепторами, выполняющими важную роль в различных процессах клеточного метаболизма. Патогенные хантавирусы взаимодействуют с интегринами типа β_3, которые в изобилии находятся на поверхности эпителиальных клеток и тромбоцитов, и участвуют в процессах активации и агрегации тромбоцитов, межклеточной адгезии, а также регуляции проницаемости стенки кровеносных капилляров. Хантавирусы не вызывают литического разрушения клеток, но нарушают их нормальные функции. Известно, что эндотелий играет критическую регуляторную роль в ангиогенезе, сосудистой проницаемости, клеточной миграции, тромбозе и воспалении [24]. Таким образом, решающее значение в патогенезе хантавирусной инфекции человека имеет прямое повреждающее действие вируса на эндотелиальные клетки капилляров (без их разрушения), результатом чего является нарушение проницаемости капилляров, отек, гипоксия, кровотечение, воспалительные реакции различной степени интенсивности, зависящие также от макроорганизма и определяющие течение и исход болезни. Несмотря на общие патогенетические механизмы, лежащие в основе хантавирусных инфекций, клинические проявления заболеваний, вызванных разными возбудителями, имеют существенные различия, касающиеся частоты и выраженности основных симптомокомплексов, а также тяжести течения болезни [23].

В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди зоонозных вирусных инфекций и одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека. Случаи заболевания ГЛПС регистрируется в 60 из 85 субъектов Российской Федерации и составляют ежегодно 6-8 тысяч больных, в целом по стране. По данным Роспотребнадзора только за период с 2000 по 2019 гг. в России было зарегистрировано 152 588 случаев заболевания ГЛПС, включая более 3,5 тысяч детей в возрасте до 14 лет. Более 600 случаев заболевания закончились летальным исходом. 148 888 случаев заражения ГЛПС (97,6%) зарегистрировано в Европейской части России, главным образом, в очагах, приуроченных к лесным ландшафтам, и 3 700 случаев (2,4%) – в Азиатской части, главным образом, на Дальнем Востоке РФ, в основном, среди жителей Приморского и Хабаровского краёв, Еврейской автономной и Амурской областей [2].

В начале 2000-х годов были открыты и изучены новые, прежде неизвестные природные очаги ГЛПС на территории России [25, 26]. К отличительным особенностям

этих очагов можно отнести ранее не известные в России вирусы – геноварианты хантавируса Добрава/Белград: вирус Куркино в центральных областях Черноземья и и вирус Сочи в Краснодарском крае, резервуарными хозяевами которых и источником заражения людей ГЛПС являются европейский подвид полевой мыши *(Apodemus agrarius)* и кавказская лесная мышь (*Apodemus ponticus*), соответственно.

Таким образом, возбудителями ГЛПС в России являются 6 видов хантавирусов, которые иммунологически и генетически значительно отличаясь друг от друга, поддерживают своё существование в природе посредством шести разных видов мышевидных грызунов, являющихся источниками заражения людей. Так, в дальневосточных регионах Российской Федерации ГЛПС вызывают вирусы Хантаан, Амур и Сеул. Другими тремя вирусами, Пуумала, Куркино и Сочи, заболеваемость ГЛПС вызывается на территории Европейской части России [2, 25 - 29].

Данные вирусологических исследований показали, что 97,7% всех случаев ГЛПС в России этиологически обусловлены хантавирусом Пуумала и, только 2,3% - хантавирусами Хантаан, Амур, Сеул, Куркино и Сочи, что указывает на ведущую этиологическую роль хантавируса Пуумала в структуре заболеваемости ГЛПС в России, природным резервуаром которого и источником заражения людей является рыжая полёвка (*Myodes glareolus*) [23].

Несмотря на общие патогенетические механизмы, лежащие в основе хантавирусных инфекций, клинические проявления заболеваний, вызванных разными возбудителями, имеют существенные различия, касающиеся частоты и выраженности основных симптомокомплексов, а также тяжести течения болезни.

Более тяжелое клиническое течение заболевания ГЛПС у больных, заразившихся в Краснодарском крае, можно объяснить, более высокой вирулентностью и, соответственно, патогенностью для человека вируса Сочи [23].

Обращает на себя особое внимание очень высокий показатель летальности среди больных ГЛПС, заразившихся вирусом Сочи (14%), не встречавшийся ранее на известных к настоящему времени эндемичных территориях России, включая районы Дальнего Востока. Таким образом, подтверждается факт того, что, имея дело с одной и весьма распространенной нозологической формой хантавирусной инфекции - ГЛПС, выявлены весьма существенные отличия в течение болезни, вызываемой различными видами хантавирусов.

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 [21], что было продемонстрировано на протяжении последних 20 лет в Китае, Южной и Северной Корее. Однако ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России, поскольку все они производятся на основе хантавирусов Хантаан или Сеул и не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей Европейской части России [2].

Трудности с разработкой культуральной вакцины против вируса Пуумала довольно долго оставались не решёнными, в основном, из-за ограниченного выбора чувствительных к размножению этого вируса клеточных культур, а также трудностей размножения и получения высоко титражного урожая этого вируса в культурах клеток.

Проведенная адаптация вирусов Пуумала и Куркино, а позднее вируса Сочи к сертифицированной перевиваемой культуре клеток VERO и возможность использования данной культуры в качестве культуры-продуцента, аттестация вакцинных штаммов в соответствии с международными требованиями, оптимизация условий концентрирования, очистки и инактивирования вирусов, а также разработка методов контроля позволили разработать технологию изготовления бивалентной (на основе вирусов Пуумала и Куркино) [12, 13], а затем трёхвалентной (на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи) вакцин против ГЛПС.

1.2 Инактивированные хантавирусные вакцины на основе субстратов ткани мозга лабораторных животных

Чрезвычайно высокая заболеваемость ГЛПС в середине 80-х годов прошлого века в азиатских странах, особенно в Китае и Корее, и отсутствие специфических средств лечения послужили основанием для создания вакцинных препаратов против хантавирусов, циркулирующих среди мышевидных грызунов и вызывающих ГЛПС в этих странах.

Приняв за основу технологию изготовления коммерческой вакцины против японского энцефалита, разработанную в 1976 году [30], авторами были приготовлены и испытаны 10 модификаций инактивированной мозговой вакцины против ГЛПС (Таблица 1).

Большинство таких вакцин содержали инактивированные формалином либо β-пропиолактоном хантавирусы, которые были культивированы в мозговой ткани лабораторных животных.

В Южной Корее для производства первых вакцин использовали суспензию мозговой ткани новорожденных крыс, инфицированных штаммом ROK 84-105 вируса Хантаан [1,31]. Этот штамм был выделен из крови больного ГЛПС в культуре клеток Vero-E6, после чего было проведено 7–10 последовательных пассажей через мозг новорожденных крыс (титр – 7 lg LD_{50}/мл) и мышей (титр – 9.2 lg LD_{50}/мл). Через 7–8 дней мозговая ткань собиралась, к ней добавляли раствор хлорида натрия с фосфатным буферным раствором, а затем полученную вируссодержащую суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут [1].

Таблица 1 - Инактивированные мозговые вакцины против хантавирусов

Страна	Хантавирус	Субстрат мозг-й ткани	Инактивация	Источник
Япония	Сеул	Новорожденные мыши	Формалин	22 (1988 г.)
Ю.Корея	Хантаан	Новорожденные крысы	- “ -	20 (1988 г.)
- “ -	- “ -	Новорожденные мыши	- “ -	20 (1988 г.)
- “ -	Пуумала	Новорожденные хомяки	- “ -	33 (1999 г.)
- “ -	Пуумала - Хантаан	- “ -	- “ -	37 (1997 г.)
С. Корея	Хантаан	Новорожденные крысы	Формалин	24 (1989 г.)
- “ -	- “ -	Новорожденные хомяки	- “ -	24 (1989 г.)
Китай	Хантаан	Новорожденные мыши	β-пропиолактон	26 (1992 г.)
- “ -	Сеул	- “ -	- “ -	27 (1990 г.)
Россия	Хантаан	Новорожденные мыши	Формалин	28 (1995 г.)

В дальнейшем для преципитации клеточных белков и жиров к надосадочной жидкости добавляли протамин сульфат. Полученную смесь подвергали центрифугированию, ультрафильтрации и ультрацентрифугированию при 40 000 g в течение двух часов при температуре 4 °С, после чего к надосадочной жидкости для инактивации вируса добавляли 0,05% раствор формалина. Затем инактивированную вакцину смешивали с адъювантом – гидроксидом алюминия.

На этапах приготовления вакцины концентрацию вирусного антигена определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Иммуногенность вакцины была изучена при интраперитонеальном введении мышам линии BALB/c. Через 2 или 4 недели после иммунизации мышей проводили забор крови для определения содержания антител к хантавирусам непрямым методом иммунофлуоресценции (МФА), ИФА и в

реакции нейтрализации с использованием культуры клеток [1].

В других странах технологии изготовления вакцинных препаратов на основе хантавирусов, культивируемых в мозговой ткани лабораторных животных, в целом, осуществлялось в соответствии с указанной выше методикой.

Так, для получения вакцины в Японии использовали головной мозг мышей, инфицированных вирусом Сеул [5]; в Северной Корее – головной мозг новорожденных крыс и хомяков, инфицированных вирусом Хантаан [32-34]; в Китае – головной мозг новорожденных мышей, инфицированных вирусами Хантаан или Сеул [35, 36]; в России – новорожденных мышей, инфицированных вирусом Хантаан [37]. В Китае для инактивации вируса в вакцине применяли β-пропиолактон [36].

На модели лабораторных мышей по результатам МФА, ИФА и реакции нейтрализации было установлено, что экспериментальные вакцины на основе хантавирусов, размноженных в тканях головного мозга лабораторных животных, вызывали удовлетворительный иммунный ответ.

Было показано, что южнокорейская коммерческая инактивированная вакцина Hantavax™ на основе вируса Хантаан, размноженного в мозговой ткани мышей линии ICR, способствовала развитию эффективного иммунитета против ГЛПС у мышей и людей [4,37]. Через месяц после однократного подкожного введения Hantavax™ у 64 добровольцев наблюдали продукцию антител к хантавирусу, выявляемую по результатам МФА (79%) и ИФА (62%) [7]. Через месяц после второй вакцинации уровень сероконверсии увеличился до 97%. Титры нейтрализующих антител после первого введения вакцины обнаруживались у 13% добровольцев и у 75% после ревакцинации.

С течением времени титры антител постепенно снижались, и уже через год после иммунизации по результатам МФА и ИФА серодиагностика была позитивной только в 37% и 43% случаев соответственно. После проведения ревакцинации у 94% и 100% привитых определялось нарастание титра нейтрализующих антител, что свидетельствовало о развитии интенсивного иммунного ответа. Приблизительно у 50% первично вакцинированных добровольцев нейтрализующие антитела продолжали вырабатываться в течение года после повторного введения [38]. В другом исследовании было показано, что после повторной иммунизации продукция нейтрализующих антител наблюдалась у 33% реципиентов [39]. На основании этого был сделан вывод о необходимости повторного введения вакцины через год после первичной иммунизации для поддержания высокого уровня антител. После ревакцинации персистенция антител определялась на протяжении двух лет [1].

В Южной Корее в период с 1991 по 1998 год вакциной Hantavax™ было

иммунизировано более 5 миллионов человек [40]. Вакцинация способствовала значительному снижению общего числа больных, госпитализированных с диагнозом ГЛПС: с 1234 случаев в 1991 году до 415 случаев в 1997 году [40]. Результаты изучения длительности персистенции поствакцинальных антител показали, что титр нейтрализующих антител после 2-х иммунизаций был невысоким, поэтому рекомендовалась ревакцинация через 2-6 месяцев. В период с 1996 по 1997 год в эндемичных по ГЛПС районах Югославии вакциной Hantavax™ было дважды первично иммунизировано и через год ревакцинировано 2000 человек. В контрольной группе было зарегистрировано 25 случаев ГЛПС и ни одного случая в группе вакцинированных [41, 42].

После иммунизации китайской инактивированной мозговой вакциной на основе вируса Хантаан, антитела через две недели по результатам МФА были обнаружены у 84%, а через год – у 18% вакцинированных. Нейтрализующие антитела были выявлены в 51% и 10% случаев, соответственно [35]. Через две недели, один и два года после ревакцинации уровень сероконверсии по результатам МФА составил 83%, 42% и 13%, а по результатам реакции нейтрализации – 62%, 41% и 25%, соответственно. После введения 30 добровольцам китайской инактивированной мозговой вакцины на основе вируса Сеул по результатам ИФА и реакции нейтрализации наблюдалась индукция высоких титров специфических антител [38].

Через три недели после повторной иммунизации северокорейской инактивированной вакциной на основе субстрата мозговой ткани лабораторных крыс, инфицированных вирусом Хантаан, антитела по результатам МФА и реакции подавления непрямой гемагглютинации были обнаружены в 78,1% и 88,8% вакцинированных, соответственно. Нейтрализующие антитела не были обнаружены. Тем не менее, в Северной Корее при иммунизации 1,2 миллиона человек было показано, что эта вакцина обладала высокой профилактической эффективностью (88–100%) [34], что может быть также объяснено выработкой тканевого протективного иммунитета, высокоэффективного при хантавирусной инфекции [43, 44].

В 1990-е годы были разработаны вакцины на основе мозгового субстрата новорожденных хомяков, инфицированных вирусом Пуумала [41, 45]. В состав однокомпонентной вакцины «PUUVAX» входил инактивированный формалином штамм К-27 вируса Пуумала, изолированный от больного ГЛПС из России (Башкирия). В одной дозе этой вакцины в 0,5 мл содержалось 5120 иммуноферментных единиц (ELISA) вирусного антигена. Введение вакцины «PUUVAX» хомякам вызывало по данным МФА и реакции нейтрализации продуцирование антител в высоких титрах к вирусу Пуумала [41].

Кроме того, была разработана бивалентная вакцина, в 1 мл которой содержалось по

5120 иммуноферментных единиц антигена вирусов Хантаан и Пуумала. По результатам МФА и реакции нейтрализации иммунизация хомяков этой вакциной способствовала выработке антител у этих животных, причем в реакции нейтрализации титр антител был более высоким, чем при иммунизации однокомпонентными вакцинами Hantavax™ и «PUUVAX» [41]. Для изучения иммуногенности и эффективности комбинированной вакцины ее дважды вводили хомякам в количестве – 1,0 мл с интервалом в месяц. С помощью МФА и реакции нейтрализации были изучены уровни антител к следующим пяти хантавирусам: Хантаан, Сеул, Добрава/Белград, Пуумала и Син Номбре. Через 30 дней после первой иммунизации животных по результатам МФА титры антител составили 78,4; 68,8; 68,8; 37,9 и 15,6, а по результатам реакции нейтрализации – 65,4; 12; 6,1; 65,6 и 0,5 соответственно. Через 30 дней после повторного введения вакцины по результатам МФА титры антител к вирусам Хантаан, Сеул, Добрава/Белград, Пуумала и Син Номбре составляли 686,9; 567,5; 550,4; 516,3 и 430,9, а по результатам реакции нейтрализации – 710,8; 41,9; 24,3; 409,9 и 1,6 соответственно. Ни у одного из привитых хомяков после заражения вирусами Хантаан, Сеул, Добрава/Белград, Пуумала не было выявлено виремии, а также вирусной РНК при исследовании лёгочной ткани методом гнездовой ОТ-ПЦР. Напротив, виремия определялась при заражении вирусом Син Номбре, а в легочной ткани был обнаружен соответствующий вирус. По результатам МФА и реакции нейтрализации у вакцинированных хомяков после инфицирования вирусами Хантаан, Сеул, Добрава/Белград, Пуумала не было выявлено значительного повышения титра антител. При этом у животных после инфицирования вирусом Син Номбре по результатам реакции нейтрализации было выявлено повышние титра антител к этому вирусу [41].

В клинических исследованиях 10 добровольцев были иммунизированы бивалентной вакциной на основе вирусов Хантаан и Пуумала и двое других были трёхкратно с интервалами в месяц иммунизированы подкожно вакциной «PUUVAX» в различных дозах. После второй и третьей вакцинации по результатам МФА и реакции нейтрализации титры антител против гомологичных хантавирусов составили 1:128–1:2048 и 1:10–1:640, соответственно [41].

Применение мозговых вакцин инактивированных формалином или β-пропиолактоном сопровождалось, в основном, местными реакциями в виде уплотнения и отека кожных тканей в местах введения. Серьезных жалоб со стороны пациентов не поступало, а вышеуказанные реакции купировались самостоятельно [7, 35]. Тем не менее, имело место сообщение о случае развития токсического эпидермального некролиза с вовлечением в патологический процесс органов зрения [46]. В целом, отсутствие серьезных побочных эффектов при применении вакцины на основе хантавирусов, культивируемых в мозговой ткани лабораторных животных,

свидетельствует о том, что они хорошо переносятся человеком [1].

1.3 Инактивированные хантавирусные вакцины на основе клеточных культур

В разработке технологии изготовления вакцин на основе хантавирусов, выращенных в культуре клеток, принимали участие, главным образом исследователи из Китая, а также, в меньшей степени, из Южной Кореи и России. В качестве субстрата использовались, в основном, четыре первичные культуры клеток: клетки почки сирийского хомяка, *Thomasomys aureus* (КПСХ), почки монгольской песчанки, *Meriones unguiculatus* (КПМП), почки полевой мыши, *A* (КППМ) и клетки куриных эмбрионов (ККЭ), а также перевиваемые линии клеток почки африканской зеленой мартышки – Vero и Vero-E6 (Таблица 2).

При использовании культур клеток КПСХ [47], КПМП [35], ККЭ [48] и Vero-E6 [49] были получены четыре однокомпонентные вакцины против вируса Хантаан. На основе культур КПСХ [38], КПМП [50] и КППМ [51] были разработаны три вакцины против вируса Сеул. Кроме того, при использовании культур КПСХ [6], КПМП [52] и Vero [53] были получены три комбинированные двухкомпонентные вакцины против вирусов Хантаан и Сеул, а на основе культуры клеток Vero была изготовлена комбинированная двухкомпонентная вакцина против вирусов Пуумала и Куркино [1, 12, 13].

Таблица 2 - Инактивированные культуральные вакцины против хантавирусов

Страна	Хантавирус	Субстрат клеток	Инактивация	Источник
Китай	Хантаан	Почек сирийского хомяка	Формалин	39 (1992 г.)
- “ -	Сеул	- “ -	- “ -	41 (1990 г.)
- “ -	Хантаан - Сеул	- “ -	- “ -	44 (1992 г.)
- “ -	Хантаан	Почек монгольской песчанки	β-пропиолактон	26 (1992 г.)
- “ -	Сеул	- “ -	- “ -	42 (2001 г.)
- “ -	Хантаан - Сеул	- “ -	- “ -	45 (1992 г.)
- “ -	Сеул	Почек полевой мыши	- “ -	43 (1998 г.)
- “ -	Хантаан	Куриного эмбриона	Формалин	40 (2001 г.)
- “ -	Хантаан - Сеул	Линии клеток Vero	β-пропиолактон	46 (2004 г.)
Ю. Корея	Хантаан	Линии клеток Vero-E6	Формалин	41 (2003 г.)
Россия	Пуумала-Куркино	Линии клеток Vero	- “ -	17 (2015 г.)

Технология изготовления вакцин на основе хантавирусов, размноженных в культурах клеток, состояла из следующих этапов: выделение вируса, осветление (низкоскоростное центрифугирование), ультрафильтрация, инактивация вируса формалином или β-пропиолактоном, очистка посредством зонального центрифугирования или аффинной хроматографии на сефарозе, стерилизующая фильтрация, сорбция на гидроксиде алюминия и испытание полученного вакцинного препарата. Двухкомпонентные вакцины получали смешиванием образцов на начальных этапах.

Иммуногенность вакцин такого типа была изучена на мышах, крысах и хомяках [54] с использованием методов: МФА, ИФА, реакции нейтрализации и реакции торможения гемагглютинации. Эффективность протективной активности определяли по результатам заражения хантавирусами предварительно иммунизированных хомяков или песчанок. По результатам этих экспериментов было установлено, что практически все испытанные вакцинные препараты обеспечивали защиту от гомологичных вирусов [38, 46].

К настоящему времени на людях были испытаны только те культуральные инактивированные вакцины, которые были разработаны и произведены в Китае. В результате клинических исследований было показано, что при трехкратном введении вакцины уровень сероконверсии по результатам реакции нейтрализации составил 90–100% [55 - 57]. Через две недели после первичной иммунизации показатель сероконверсии достиг 51–82%, а через год снизился до 10–12%. После повторного введения вакцины уровень сероконверсии повысился до 62–80%, а затем через один и два года после ревакцинации опустился до 41% и 23–31%, соответственно. Уровень сероконверсии по результатам МФА оказался выше. Таким образом, после первого введения вакцины вскоре происходило значительное снижение титров антител, специфичных к хантавирусам. После ревакцинации, проведенной через год, наблюдался выраженный подъем продукции антител, а затем к концу второго года происходило медленное снижение их уровня. При этом антитела по-прежнему обеспечивали защиту от вируса [58].

В масштабном исследовании на людях были подвергнуты сравнению 3 вакцины: 1) на основе клеток КПСХ, инфицированных вирусом Сеул, 2) на основе клеток КПМП, инфицированных вирусом Хантаан, 3) на основе клеток мозговой ткани новорожденных мышей, инфицированных вирусом Хантаан.

По протоколу вакцинации при первичной иммунизации первую вакцину вводят три раза с интервалами в 28 и 14 дней, после чего через год проводят ревакцинацию. Первичная иммунизация второй вакциной проводится посредством трехкратного введения в 0, 7 и 14

дни с последующей ревакцинацией через год. Иммунизация третьей вакциной проводится трёхкратно с интервалами в две недели с последующей ревакцинацией через год [1].

Из 55 000 трёхкратно вакцинированных побочные эффекты наблюдались у 2,6% лиц, в целом, включая 7,3% после иммунизации вакциной №3, 3% - вакциной №1 и 1,9% - вакциной №2 [58].

В настоящее время в Китае разрешена продажа четырех инактивированных вакцин на основе хантавирусов, размноженных в культуре клеток, и одной вакцины на основе вируса, размноженного в мозговой ткани лабораторных мышей. Эти вакцины успешно применяют в высоко эндемичных по ГЛПС районах страны с 1995 года (в 2007 году была принята Государственная программа по вакцинации населения против ГЛПС). Было показано, что массовая вакцинация безопасна и эффективна [59]. В настоящее время в Китае для профилактики ГЛПС ежегодно производят и применяют около двух миллионов доз инактивированных вакцин [60].

Кроме первичных культур клеток экспериментальная вакцина была разработана на основе вируса Хантаан, размноженного в линии перевиваемых клеток Vero-E6, культивируемых на микроносителях [56]. При иммунизации мышей этой вакциной уровень нейтрализующих антител был в пять раз выше, чем при использовании вакцины Hantavax™.

Следует отметить, что ни одна из разработанных к настоящему времени вакцин против ГЛПС не получила одобрения для применения в странах Европы. Согласно результатам исследований на животных, иммунизация вакцинами на основе вирусов Хантаан или Сеул не в состоянии предотвратить развитие инфекции, вызванной вирусом Пуумала [61, 62]. По разным причинам попытки технологической разработки вакцины против ГЛПС на основе вируса Пуумала заканчивались безуспешно, в основном из-за трудностей размножения и получения достаточного урожая этого вируса в культурах клеток. В то же время, применение мозговых вакцин не соответствует нормам Евросоюза.

В связи с одновременной циркуляцией хантавирусов Пуумала и Куркино в странах Европы и на территории Европейской части России эффективной для применения в Европе могла бы быть только вакцина, содержащая антигены обоих этих вирусов [3, 63]. Подобные экспериментальные вакцины были разработаны в России. Так, на основе перевиваемой линии клеток Vero были разработаны технологии изготовления инактивированных формалином двух вакцинных препаратов: моновакцины с использованием вируса Пуумала и двухкомпонентной вакцины на основе двух вирусов Пуумала и Куркино [3, 12].

Вакцинный штамм вируса Пуумала был изолирован в культуре клеток Vero-E6 во время вспышки ГЛПС в Башкортостане в 1997 году от больного ГЛПС [64], а затем адаптирован к размножению в высоких титрах в культуре клеток Vero с применением питательной среды без добавления сыворотки крови. Вакцинный штамм вируса Куркино был изолирован от больного ГЛПС во время вспышки заболевания в Липецкой области в 2006 году и адаптирован к росту в культуре клеток Vero с применением питательной среды без добавления сыворотки крови [12]. Этот штамм согласно генетическим и антигенным свойствам принадлежит к генотипу Куркино хантавируса Добрава/Белград [65, 66].

С целью определения антигенов хантавирусов Пуумала и Куркино были разработаны два вида диагностических ИФА тест-систем [67]. Для выявления антигена вируса Пуумала использовались моноклональные антитела к гликопротеинам оболочки этого вируса, а для вируса Куркино и других хантавирусов – моноклональные антитела к белкам нуклеокапсида вирусов Куркино и Пуумала. С помощью этих диагностикумов в комбинированной вакцине выявляли специфические хантавирусные антигены.

Технология изготовления вакцины состояла из следующих этапов: сбор вирусного материала в виде культуральной жидкости клеток Vero, инфицированных вирусами Пуумала и Куркино; осветляющая фильтрация; концентрирование посредством ультрафильтрации в тангенциальном потоке; очистка с использованием аффинной хроматографии на сефарозе 6FF; инактивация 0,04% раствором формалина; объединение моновалентных полуфабрикатов вакцины; добавление в качестве адъюванта гидроксида алюминия.

Комплексная аттестация экспериментальной комбинированной вакцины на основе вирусов Пуумала и Куркино, получившей название Комби-ГЛПС-Вак [12, 13], показали ее соответствие требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам, вводимым людям. Иммунизация мышей линии BALB/c вакциной Комби-ГЛПС-Вак индуцировала выработку антител к вирусам Пуумала и Куркино, в том числе вируснейтрализующих со средними титрами 1:136 и 1: 120 соответственно [1].

1.4 Рекомбинантные и ДНК-овые хантавирусные вакцины

Помимо инактивированных цельновирионных вакцин, к настоящему времени авторами предприняты попытки создания рекомбинантных генно-инженерных хантавирусных вакцин. К ним относятся четыре вакцины на основе субклонированных кДНК, представляющих M- и S-сегменты РНК вируса Хантаан, встроенных в геном вируса осповакцины [62, 68] и в геном вируса Синдбис [69], а также вирусов Сеул и Син Номбре, встроенных в геном цитомегаловируса [70, 71].

На лабораторных животных было продемонстрировано, что введение N белка, гликопротеинов G1 и G2 вируса Хантаан, экспрессированных в бакуловирусной системе и векторами вируса осповакцины, вызывает развитие иммунитета к вирусу Хантаан [62, 72, 73]. Также было показано, что при иммунизации вакциной на основе антигенов вируса Хантаан, экспрессированных векторами вируса осповакцины, образуется перекрестный иммунитет к вирусу Сеул [62, 73]. Такая вакцина была изучена в ходе двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования фазы II на 142 добровольцах. Только у 72% вакцинированных определялись нейтрализующие антитела к вирусу Хантаан [74]. Вследствие выявления ограниченного уровня сероконверсии и возможного развития побочных эффектов при применении вакцины испытание было прекращено [63, 75].

На модели сирийских хомяков было показано, что иммунизация рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим белок N и гликопротеины G1 или G2 вируса Андес, защитила животных от инфицирования летальной дозой гомологичного вируса [76]. Также при введении способного к репликации рекомбинантного аденовируса собак, экспрессирующего гликопротеины G1 или G2 вируса Сеул, наблюдалось образование нейтрализующих антител и формирование иммунитета к вирусу Сеул [77, 78].

При испытании препаратов, сконструированных на основе встроенных в геном вируса осповакцины сегментов генома Хантаан, на волонтерах было установлено, что среди ранее привитых против оспы, процент выявления вируснейтрализующих антител к вирусу Хантаан составлял лишь 26%, в то время как у не привитых – 72% [74]. 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 – так называемых ДНК-вакцин [79, 80]. Их отличают полноформатный защитный эффект (одновременно "гуморальный" и клеточный), а также безопасное производство (когда речь идет о хантавирусах), снятие проблемы транспортировки готовых препаратов, связанной с необходимостью организации так называемой "холодовой цепочки", - и др. В общем виде эти вакцины представляют собой гены протективных белков, способные контролировать в клетках вакцинируемого организма синтез протективных белков, обусловливающих формирование защитного иммунного ответа. Применительно к хантавирусам подобная ДНК-вакцина на основе вируса Сеул разработана в США [81,82].

ДНК-вакцина, экспрессирующая гликопротеины вирусов Хантаан и Пуумала, была введена 28 добровольцам трансдермально с помощью частиц, несущих ДНК [63, 83].

Согласно полученным данным, у вакцинированных происходила выработка значительного количества нейтрализующих антител против обоих хантавирусов [1].

Известно о разработке аэрозольной ДНК-вакцины (ПЭА + рДНК), которая содержит комплексы полиэтиленимина с рекомбинантной ДНК, экспрессирующей ген гликопротеина G1 с помощью промотора цитомегаловируса. Такая вакцина была введена мышам линии BALB/c посредством ультразвукового аэрозольного генератора [84]. Кроме того, мышам с помощью интраперитонеальной инъекции ввели адъювант – протеогликан природного происхождения. Протокол иммунизации включал в себя первичную двукратную вакцинацию и однократную ревакцинацию. По результатам ИФА, у мышей аэрозольная ДНК-вакцина (ПЭИ + рДНК) способствовала продукции антител IgM, IgG и IgA, специфических к вирусу Пуумала.

Экспериментальные вакцины на основе ДНК, экспрессирующей гены гликопротеинов оболочки вирусов Хантаан или Пуумала, были изучены в клиническом исследовании первой фазы, в котором было задействовано три группы по девять человек [85]. Иммунизация добровольцев осуществлялась трехкратно с интервалами в четыре недели с помощью метода трансэпидермального введения частиц золота, несущих к-ДНК М сегмента (Gn и Gc) вирусов Хантаан (штамм 76-118), Пуумала (штамм P360) или двумя вакцинами сразу. В одной дозе вакцины содержалось 8 μг ДНК и 4 мг золота. При ее введении серьезных нежелательных явлений не возникало. Наблюдались такие неспецифические реакции, как слабость, головная боль, недомогание, миалгии и лимфаденопатия. Наличие нейтрализующих антител оценивалось по результатам исследования образцов крови, взятых в 0, 28, 56, 84, 140 и 180 дни. В группах, где добровольцам вводили вакцину либо против вируса Хантаан, либо против вируса Пуумала, нейтрализующие антитела были выявлены в 30% и 44% случаев, соответственно. В группе, где иммунизация осуществлялась обеими вакцинами, антитела к одному или двум вирусам определялись только у 56% добровольцев и только в 22% к обоим вирусам одновременно [85].

Мультиэпитопная химерная ДНК-вакцина была создана на основе вирусов Сеул, Хантаан и Пуумала [86]. Вакцина была испытана на мышах линии BALB/c. По данным авторов, химерная вакцина способствовала формированию выраженного гуморального и клеточного иммунитета (по результатам выработки γ интерферона и пролиферации спленоцитов), однако нейтрализующие антитела были выявлены только к вирусам Хантаан и Сеул [1].

В работе американских учёных [87] приводятся результаты 1-й стадии клинических испытаний ДНК вакцин против Пуумала, Хантаан и комбинированной Пуумала + Хантаан с введением вакцины внутримышечно с помощью инжектора, вызывающего

электропорацию (в отличие от внутрикожного введения этой же вакцины) [85, 88]. Такой метод введения вакцины позволил увеличить однократно вводимую дозу до 2 мг ДНК (вместо 8 μг при внутрикожном введении) [89]. Сероконверсия к вирусу Пуумала при иммунизации гомологичной, так же как и комбинированной вакцинами была выше, чем при внутрикожном ее введении. Сероконверсия к гомологичным вирусам при иммунизации моновакцинами была выше, чем при внутрикожном ее введении. В то же время, при введении комбинированной вакцины иммунный ответ к вирусу Хантаан был значительно ниже (3 из 9 к вирусу ХТН, 7 из 9 к вирусу Пуумала) [90]. В попытке преодолеть интерференцию между вакцинами, в опытах на хомячках увеличивали соотношение Хантаан: Пуумала в комбинированной вакцине (2:1, 10:1), однако это не изменило результат. Комбинированная вакцина индуцировала продуктивные антитела к вирусу Пуумала, но не Хантаан. В связи с этим, была предпринята попытка оптимизации кодонов экспрессии ДНК Хантаан. Для проверки иммуногенности кодон-оптимизированной конструкции ДНК вакцины были иммунизированы хомячки (моно Хантаан, Пуумала и Хантаан + Пуумала). После иммунизации моно Хантаан вакциной нейтрализующие антитела были выявлены к вирусам Хантаан, Добрава/Белград, Сеул, но не к Пуумала. После иммунизации моно Пуумала вакциной нейтрализующие антитела вырабатывались к Пуумала и в низких титрах к Добрава/Белград и Сеул, но не к Хантаан. После иммунизации комбинированной вакциной приблизительно равный иммунный ответ был получен ко всем четырем вирусам [87]. Для подтверждения этих результатов необходимы дальнейшие исследования.

Известно о разработке мультиэпитопной химерной ДНК-вакцины против вирусов Сеул, Хантаан и Пуумала [86]. У лабораторных животных после введения вакцины выявляли активизацию гуморального и клеточного иммунитета против всех трёх вирусов.

Несмотря на обнадеживающие результаты, ДНК-вакцины против хантавирусных инфекций в клинических испытаниях показали невысокую иммуногенность. Кроме этого, остается опасение, что ДНК, вводимая извне, может интегрировать в хозяйскую ДНК. Это повышает риск малигнизации клеток, геномной нестабильности, дисрегуляции клеточного роста [91]. В то же время, ДНК вакцины могут применяться и, возможно, успешно, для получения антител с лечебной целью (использование трансгенных животных с гуманизированной иммунной системой в качестве доноров антител) [1, 92 - 94].

1.5 Заключение

Разработка хантавирусных вакцин обусловлена, прежде всего, наличием эндемичных по хантавирусным лихорадкам географических территорий с высокой заболеваемостью людей. Так, потенциальными кандидатами для вакцинопрофилактики ГЛПС являются

жители стран Евразии, в особенности стран с высоким уровнем заболеваемости – Китай, Россия, Северная и Южная Корея, Финляндия, Швеция, Германия. В странах Южной и Северной Америки, где уровень заболеваемости ХПС значительно ниже, необходимость вакцинации против этой инфекции не столь очевидна.

С учетом количества лиц, подвергаемых возможному риску заражения хантавирусными лихорадками, можно говорить, что потенциальная потребность в хантавирусных вакцинах в Западном полушарии, по всей вероятности, исчисляется десятками миллионов доз, а в Евразии – превышает сто миллионов доз [95]. Очевидно, что экономически целесообразно было бы осуществлять разработку технологии изготовления вакцинных препаратов, одновременно высоко эффективных как для профилактики ГЛПС, так и ХПС. Теоретически вакцина против хантавирусных инфекций должна обеспечивать долговременную защиту от всех эпидемиологически значимых хантавирусов, циркулирующих в эндемичном регионе, причем схема её применения не должна превышать трех кратного введения с минимальным интервалом между введениями. Побочные эффекты при использовании такой вакцины не должны быть выраженными, и желательно, чтобы ее можно было использовать одновременно с вакцинами против других инфекций [95].

Аэрозольный механизм заражения возбудителями ГЛПС и ХПС вызывает необходимость проведения исследований с хантавирусами в лабораториях с высоким уровнем биологической безопасности, что представляет определенные трудности при разработке вакцинных препаратов. Преодолеть их позволяет технология получения вакцин на основе рекомбинантной ДНК. За последние десять лет несколькими группами ученых были опубликованы многообещающие результаты доклинических исследований таких вакцин на моделях мелких лабораторных животных. Тем не менее, для создания вакцины, которая была бы приемлема для вакцинопрофилактики людей, необходимы дальнейшие исследования.

В настоящее время для снижения заболеваемости хантавирусными инфекциями в эндемичных районах могут применяться только инактивированные культуральные вакцины. В целях профилактики ГЛПС (в основном в Китае, Северной и Южной Корее) было использовано несколько миллионов доз таких вакцин, причем серьезных нежелательных явлений зарегистрировано не было, что свидетельствует об их хорошей переносимости [1].

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Экспериментальные серии поливалентной вакцины для доклинических исследований

2.1.1 Культура клеток

Использование линии клеток VERO для производства инактивированной вакцины ГЛПС стало возможным в результате успешной адаптации первично выделенных штаммов 3-х хантавирусов к размножению в клетках VERO в условиях отсутствия сыворотки крови животных в среде поддержки роста клеток. В качестве субстрата для размножения хантавирусов-возбудителей ГЛПС использовали линию перевиваемых клеток почек зеленой мартышки VERO, полученную из ВОЗ (WHO Vero cell bank from ECACC, Accession number 991042). Линия клеток VERO в качестве возможного субстрата для производства инактивированных вакцин рекомендована ВОЗ [96], а также Ученым Советом ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Протокол №3 от 20 марта 2003 г.) и Комитом медицинских иммунобиологических препаратов (Протокол №3 от 22.05.2003 г.). Рабочий банк клеток линии VERO (РБК VERO) – пул клеток, приготовленных на уровне 139 пассажа клеток VERO, аттестованных на идентичность и отсутствие контаминации посторонними агентами, расфасованных в 2 мл криопробирки и хранящийся в жидком азоте при температуре минус 196°С.

Для целей титрования вируса и определения нейтрализующих антител использовали культуру клеток Vero E6 (ATCC® No. CRL-1586), полученную из коллекции культур клеток США. Линия клеток Vero E6 является наиболее пермиссивной для хантавирусов, поскольку именно в этой культуре были изолированы подавляющее большинство хантавирусов.

2.1.2 Вирусы

Производственные штаммы вирусов

Для изготовления вакцины ГЛПС-Вак использовали штаммы 3-х хантавирусов:

- штамм ТКД/Уфа-97 вируса Пуумала (ПУУ) выделен из лёгочной ткани погибшего от ГЛПС больного в Башкирии;
- штамм Р-88/Хабаровск-89 вируса Хантаан (ХТН) выделен из крови больного тяжелой формой ГЛПС в Хабаровском крае;
- штамм Орлова/Сочи-09 вируса Сочи (СОЧИ) (подтип вируса Добрава/Белград) выделен из крови больной, погибшей от ГЛПС в Краснодарском крае.

Краткая история получения вакцинных штаммов.

После выделения и закрепления в пассажах (10-15 пассажей) в культуре клеток Vero-E6 штаммы ТКД/Уфа-97, Р-88/Хабаровск-89, Орлова/Сочи-09 хранились в коллекции вирусов лаборатории геморрагических лихорадок ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН при температуре минус 70 ^{o}C в виде вируссодержащей суспензии зараженных клеток. После предварительной активизации инфекционной активности хранившихся штаммов с помощью 2-х кратного пассирования в культуре клеток Vero-E6 штаммы были адаптированы к линии перевиваемых клеток почек зеленой мартышки VERO, аттестованной и рекомендованной в качестве возможного субстрата для производства инактивированных вакцин. На уровне 7-го пассажа в клетках VERO штаммы были очищены от клеточной ДНК путём обработки дезоксирибонуклеазой в концентрации 0,3 мкг/мл в оптимальных для этого фермента условиях. При этом, по данным метода молекулярной гибридизации, концентрация клеточной ДНК снизилась до уровня менее 10 нг/мл. Далее, вирус был сконцентрирован осаждением 7,5%-ным ПЭГ-6000 при (6±2) °С в течение (18±2) час и очищен зональным центрифугированием (25.000 об/мин, 3,5 час, 5°С) в градиенте плотности сахарозы (5-20%) с последующей фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

После адаптирования к культуре клеток VERO вышеперечисленные штаммы получили название вакцинных штаммов:

- штамм ПУУ-ТКД/Vero (вирус Пуумала), депонирован в ГКВ, № 1026, 2009 г.,

и защищен патентом на изобретение №2423520 от 10.07.2011 г.

- штамм ХТН-Р88/Vero (вирус Хантаан), депонирован в ГКВ, № 1283, 2018 г.,
- штамм ДОБ-Сочи/Vero (вирус Сочи), депонирован в ГКВ, № 1282, 2018 г.

Последние два штамма защищены патентом на изобретение №2683509 от 28.03.2019 г.

Вакцинные штаммы ПУУ-ТКД/Vero, ХТН-Р88/Vero и ДОБ-Сочи/Vero обладают видовой специфичностью, способностью размножаться в чувствительных к хантавирусам культурах клеток VERO и Vero-E6, к которым эти штаммы адаптированы, с достаточным накоплением иммунологически активного материала.

Видовая специфичность вакцинных штаммов была установлена в опытах нейтрализации в культуре Vero E6 с помощью перекрёстного титрования с иммунными сыворотками (Таблица 3).

Таблица 3 - Типирование вакцинных и тест-штаммов вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи

Вирус	Штамм	Титр нейтрализующих антител в типоспецифических сыворотках					
		ПУУ- К4[1)]	ПУУ-10289*	ДОБ-К6[2)]	ДОБ-1334*	ХТН-К1[3)]	ХТН-3316*
ПУУ	ПУУ-ТКД/Vero	**640**	**2560**	<20	<20	<20	<20
	К-27/Уфа-85	**640**	**2560**	<20	<20	<20	<20
СОЧИ	ДОБ-Сочи/Vero	<20	<20	**320**	**2560**	<20	0
	Ар1595/Сочи-01	<20	<20	**640**	**2560**	<20	0
ХТН	ХТН-Р88/Vero	<20	<20	<20	40	**320**	**640**
	76/118	<20	<20	<20	20	**320**	**640**

1), 2), 3) – типоспецифичные иммунные кроличьи сыворотки
* типовые сыворотки реконвалесцентов после переболевания ГЛПС

Полногеномные сиквенсы производственных вакцинных штаммов зарегистрированы в GenBank под номерами:

BankIt2108429 HTN-P88/VERO_S MH251328

BankIt2108429 HTN-P88/VERO_M MH251329

BankIt2108429 HTN-P88/VERO_L MH251330

BankIt2108429 PUU-TKD/VERO_S MH251331

BankIt2108429 PUU-TKD/VERO_M MH251332

BankIt2108429 PUU-TKD/VERO_L MH251333

BankIt2108429 DOB-SOCHI/VERO_S MH251334

BankIt2108429 DOB-SOCHI/VERO_M MH251335

BankIt2108429 DOB-SOCHI/VERO_L MH251336

Производственные штаммы получены в результате пассирования вакцинных штаммов (1-3 пассажа) по достижении стабильного размножения в культуре клеток VERO. Производственные штаммы ПУУ-ТКД/Vero, ХТН-Р88/Vero и ДОБ-Сочи/Vero, аттестованные в соответствии с международными требованиями [97], являются исходными для приготовления штаммового, маточного и посевного запасов вирусов. Они хранятся в ампулах (типа Cryotube) при температуре минус (190±2)^{0}С в Дьюаре с жидким азотом до 10 лет с проверкой антигенной специфичности и инфекционного титра не реже одного раза в два года.

В качестве тест-штаммов были использованы:

- вирус Пуумала, штамм К-27/Уфа-85, изолирован из крови больной ГЛПС. Депонирован в ГКВ, № 986, 2003 г.
- вирус Хантаан, штамм 76/118, изолирован от полевой мыши, протипный штамм вируса Хантаан [98]

- вирус Сочи, штамм Ар1559/Сочи-01, изолирован от кавказской лесной мыши. Депонирован в ГКВ, № 1031,2009 г.

Тест-штаммы пассируются в клетках Vero E6 и используются для контроля вакцины.

2.1.3 Лабораторные животные

Все животные, использованные в экспериментах, поступали из филиала «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России.

Лабораторные животные до начала исследования содержались 5 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. В каждой клетке содержали по 10 животных одного пола.

Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы. Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, рассаживание животных осуществлялось случайным отбром. Маркировка клетки кодировала пол животных, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер, который наносился несмываемым маркером на теле животного [14].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» и Правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) [16, 99]. Кормление животных проводилось на основании «Санитарных правил по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных МЗ СССР 06.07.73 г. и приказа МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. [99].

Для содержания лабораторных животных готовили корм ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.

Животным давалась вода, очищенная и нормированная по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании ГОСТ 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества». Вода в стандартных поилках со стальными крышками-носиками, давалась ad libitum.В качестве подстила использовали древесные гранулы 6 мм.

Содержание животных осуществлялось в контролируемых условиях окружающей среды (18-22°С и относительной влажности воздуха 50-70%), NH3=0,001 мг/м3, CO2=0,1%. Световой режим составлял 12 часов света и 12 часов темноты. Устанавливался режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период адаптации и в ходе эксперимента не произошло.

Вакцина и контрольный препарат вводили животным внутримышечно через стерильную инъекционную иглу 12,7 мм в указанных дозах. Внутривенно вакцинный препарат вводили без алюминия. В ночь перед некропсией животных лишали корма, доступ к воде при этом не ограничивался. Эвтаназия осуществлялась с помощью CO_2 – камеры. Животные находились там до полной потери сознания. Забор крови осуществляли методом декапитации.

При анализе индивидуального поведения и неврологического статуса фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова.

Свободную двигательную активность ориентировочно-исследовательское поведение животных исследовали в тесте «открытого поля», представляющего собой квадратную площадку площадью 0,25 м^2, разделенную на 9 квадратов, ограниченную непрозрачными бортами высотой 20 см. В площадке имеется 16 отверстий, моделирующих норки. Освещенность открытого поля равнялась 100 лк. Во время опыта экспериментальный вольер находился в специальной звукоизолированной комнате. Продолжительность опыта для каждой отдельной мыши составляла 3 минуты. На основании поведенческого атласа для грызунов выбирался ряд элементарных двигательных актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение в «открытом поле».

Поведение мышей в приподнятом крестообразном лабиринте «ПКЛ» исследовали в крестообразной установке, состоящей из двух открытых рукавов 30х5 см и двух закрытых рукавов 30х5 см, расположенных перпендикулярно относительно друг друга. Высота над полом 0,5 м. Животное помещали в центр лабиринта. Фиксировали время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество заходов в закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения в центре. Продолжительность теста для каждой отдельной мыши составляла 3 минуты.

Животные, подверженные полной некропсии с оценкой внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого. Органы,

извлеченные при некропсии, взвешивали, парные органы взвешивались вместе. Данный показатель был использован для расчета процентного отношения массы органов к массе тела. Процедуру взвешивания органов животных осуществляли на электронных весах. Перечень органов, подлежащих взвешиванию: сердце, легкие с трахеей, тимус, печень, селезенка, почки, надпочечники, яички (два) - самцы, яичники (два) - самки, головной мозг [14].

Расчет $ЛД_{50}$ не осуществлялся, так как не было отмечено гибели животных ни в одной экспериментальной группе.

2.1.4 Методы контроля, регламентируемые Государственной Фармакопеей

Неспецифические методы контроля, использованные в процессе изготовления вакцины выполненны в соответствии с рекомендациями Государственной фармакопеи РФ (Таблица 4).

Таблица 4 - Методы контроля

Виды контроля	Регламентирующий документ
1. Стерильность	ГФ XIII. ОФС «Стерильность»
2. Контроль посторонних агентов	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0006.15
3. Белок по Лоури	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0023.15
4. Содержание БСА	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0020.1
5. Бактериальные эндотоксины	ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0006.15
6. Содержание алюминия	ГФ XIII, ОФС.1.2.2.2.0001.
7. Пирогенность	ГФ XIII ОФС.1.2.4.0005.15
8. pH	ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15
9. Формальдегид	ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0024.15

2.1.5 Специфические методы, разработанные для контроля хантавирусных вакцин

2.1.5.1 Метод определения инфекционной активности вируса применяли для индикации и титрования вируса по выявлению фокусобразующих единиц (ФОЕ) [100], основан на постулате - 1 ФОЕ соответствует одной вирусной частице.

Проведение исследования

1. Во вспомогательном 24 луночном планшете готовят разведения исследуемого вирус содержащего материала (2-х или 10-и кратные, в зависимости от целей опыта).
2. На монослой клеток Vero-E6, выращенный в лунках планшета, вносят разведения исследуемого материала по 100 мкл на лунку.

3. После контакта с клетками при температуре 37±1 °С в течение 1 часа инокулят удаляют и вносят метилцеллюлозное покрытие по 800 мкл на 1 лунку. Для вируса Пуумала используют 0,4%, для вирусов Хантаан и Сочи – 0,6 % метилцеллюлозное покрытие. Планшет помещают в CO_2 термостат.
4. Через 6 – 7 суток инкубирования инфицированных клеток при температуре 37±1 °С в CO_2-термостате инфекционные фокусы проявляют твердофазным иммуноферментным методом.

Выявление инфекционных фокусов (ФОЕ)

5. Из лунок планшета, аккуратно перевернув его, сливают метилцеллюлозное покрытие в ванночку с дезинфектантом (экомин).
6. Клетки монослоя в лунках промывают физиологическим, 0,9 % раствором NaCl (ФР), для этого в лунки планшета вносят ФР до краев лунки (осторожно, чтобы не повредить клеточный слой), через 10 мин ФР из лунок удаляют.
7. Для фиксации монослоя клеток в лунки планшета вносят последовательно дважды по 400 мкл охлажденный до 4±2 °С этиловый спирт 96° (экспозиция в течение 15 мин при температуре от 18 до 25°С).
8. Фиксатор удаляют и клеточный слой промывают. Для этого содержимое лунок вытряхивают в ванночку, панель постукивают по нескольким слоям фильтровальной бумаги в положении вверх дном для удаления остатков фиксатора, далее 3-х кратно по 10 мин промывают ФР.
9. Вносят в каждую лунку по 200 мкл специфических анти-хантавирусных антител в рабочем разведении.
10. После экспозиции при температуре 37±1 °С в течение 1 часа содержимое лунок удаляют, планшет постукивают по нескольким слоям фильтровальной бумаги для удаления остатков сыворотки и 3-х кратно по 5 мин промывают ФР.
11. Вносят в каждую лунку по 200 мкл конъюгата.
12. Через 1 час экспозиции при температуре 37±1 °С клетки промывают ФР по 10 мин 3-х кратно.
13. Вносят субстрат-индикаторную систему.
14. Через 15 – 20 мин лунки планшета промывают проточной водой, высушивают и учитывают опыт.

Учет результатов

Фокус образующие единицы (ФОЕ) определяют и подсчитывают визуально. Подсчитывают количество ФОЕ в лунках соответствующих разведений вирус

содержащего материала, умножают на индекс разведения исследуемого образца. Титр вируса выражают в десятичных логарифмах ФОЕ/мл.

2.1.5.2 Типоспецифичность вирусных штаммов определяли в реакции нейтрализации по редукции ФОЕ. Достоверным иммунологическим отличием штаммов является 4-х кратная и более разница в титрах контрольных сывороток в перекрестных опытах нейтрализации с прототипными штаммами хантавирусов [101].

Проведение исследования

Определение рабочей дозы вируса

В предварительном опыте определяют рабочую дозу вируса для тест-штаммов и исследуемого вируссодержащего материала методом титрования ФОЕ (2.1.5.1).

Постановка реакции нейтрализации ФОЕ

1. Контролируемые вируссодержащие материалы и тест-штаммы вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи разводят до рабочего разведения.
2. Готовят двукратные разведения контрольных сывороток (против вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи) в диапазоне от 1:20 до 1280.
3. В лунки вспомогательного планшета вносят по 220 мкл разведений сыворотки, в лунку контроля вируса вносят 330 мкл разбавителя.
4. К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем (220 мкл) рабочего разведения вируса, в лунку с контролем вируса вносят 330 мкл рабочего разведения вируса.
5. Смесь инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 1 часа.
6. После истечения контакта, каждое разведение вирус сывороточной смеси вносят в объеме 200 мкл в двойном повторе в лунки панели с монослоем клеток VeroE6. Контроль вируса вносят в лунки панели в объеме 200 мкл в тройном повторе. Зараженную культуру инкубируют в течение 1 ч при температуре 37±1 °С.
7. После контакта с клетками при температуре 37±1 °С инокулят удаляют и вносят метилцеллюлозное покрытие по 800 мкл на 1 лунку. Планшет помещают в CO_2 термостат.

   Через 6 – 7 суток инкубирования планшета при температуре 37±1 °С в CO_2 термостате метилцеллюлозное покрытие удаляют и проводят тест по определению ФОЕ (см. «Проявка инфекционных фокусов (ФОЕ)»).

Оценка и представление результатов:

Фокус образующие единицы (ФОЕ) определяют и подсчитывают визуально. Подсчитывают количество ФОЕ в лунках планшета и определяют среднеарифметическое число ФОЕ в лунках с контролем вируса, а также среднеарифметическое число ФОЕ

выжившего вируса в присутствии иммунной сыворотки. За титр вируснейтрализующих антител принимают разведение сыворотки, подавляющее 50 % ФОЕ, выявленных в контроле вируса.

2.1.5.3 Иммуногенная активность определяется по выявлению специфического иммунного ответа на введение мышам линии BALB/c вакцины ГЛПС-Вак (продукция нейтрализующих антител к хантавирусам Пуумала, Хантаан и Сочи) [101].

2.1.5.4 Контроль специфической безопасности (отсутствие живого хантавируса) осуществляется по ранее разработанной методике [13].

Проведение исследования

1 этап. Пассажи контролируемых материалов в культуре клеток Vero-E6

Контролю подлежат:

вакцинный полуфабрикат инактивированная моновакцина – аликвота объемом 2 мл;

готовая вакцина – 5 ампул исследуемой серии.

Содержимое ампул объединяют в одну ёмкость. Полученную смесь вакцины в объёме инокулята 0,5 мл/фл вносят в 2 флакона (площадью 25 см^2) с заранее выращенной монослойной культурой клеток Vero-E6. После 1 ч инкубации при температуре 37±1 °С содержимое флакона удаляют и добавляют во флаконы по 10 мл среды Игла МЕМх2. Через 7 – 8 суток культивирования при температуре 37±1 °С монослой клеток снимают со стекла раствором, состоящим из равных объёмов трипсина и версена, клетки суспендируют в 3,0 мл среды Игла МЕМх2, подвергают однократному замораживанию и оттаиванию. Полученный лизат клеток с 1 пассажем вакцины используют для следующего пассажа на монослое клеток Vero -E6.

Таким образом проводят 3 серийных пассажа вакцины на монослое клеток Vero -E6 с инкубацией каждого пассажа7 – 8 суток. В качестве отрицательного контроля проводят пассирование культуры клеток Vero -E6 без внесения вакцины.

2 этап. Контроль выжившего вируса осуществляют методом выявления инфекционных фокусов (ФОЕ).

2.1.5.5 Контроль специфической активности вакцинного препарата проводили иммуноферментным методом по содержанию N белка [67] на стадиях получения первичных и вторичных (очищенных) моновалентных концентратов до и после инактивирования, трехвалентного полуфабриката вакцины против ГЛПС до сорбции на гидроокиси алюминия.

Использовалась тест-система, основу которой составляют аффинно-очищенные моноклональные антитела класса IgG, полученные после иммунизации мышей BALB/c очищенными инактивированными препаратами вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи [67].

Использованы клоны антител к вирусам Пуумала (мАТ Н6) и Добрава/Белград (мАТ А4), в равной степени перекрестно реагирующие с антигенами вирусов Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан (титр антител в диапазоне 1:2048 – 1: 4096, при концентрации белка 1 мг/мл);

Оборудование, материалы и реагенты

- Термостат на 37±1 °С, любой марки;
- Холодильник- морозильник (4 ±2 ^{0}С; минус 20 ^{0}С), «Стинол», или с соответствующими характеристиками;
- Промыватель планшет «Washer Bio-Rad» или любой автоматический промыватель;
- Спектрофотометр иммуноферментный планшетный, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм, “EPSSON” или аналогичный по характеристикам;
- Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5 %);

Планшет для иммунологических реакций с высокой сорбционной активностью;

ИГ$^+$ – мышиные моноклональные антитела Н6 (изотип IgG2b) - специфичные к эпитопу нуклеокапсидного белка вируса Пуумала, иммуносорбент;

ИГ$^-$ – мышиные иммуноглобулины класса IgG, не содержащие антител к хантавирусам, иммуносорбент;

К$^+$ – контрольный антиген с известным титром, представляющий собой хроматографически очищенный концентрат вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, полученных при размножении в культуре клеток Vero, инактивированный;

К$^-$ – контрольный антиген, представляющий собой хроматографически очищенный концентрат культуральной жидкости не зараженной культуры клеток Vero;

Коньюгат – мышиные моноклональные антитела мАТ А4 (изотип IgG2a), специфичные к эпитопу нуклеокапсидного белка ортохантавируса Добрава/Белград, меченные пероксидазой хрена;

Вода для инъекций (ФС 42-2619-97), для разведения растворов;

БСА – бычий сывороточный альбумин, сухой, стабилизатор, (Sigma, кат. № 8159);

Твин -20 – жидкий (Sigma, кат. № Р1379);

Субстат-индикаторная система, ТМВ (Sigma №Т8665) в готовом виде;

Стоп-реагент – кислоты серной раствор 2 моль/л, "хч" ГОСТ 4204-77;

ФСБ$_{x100}$ – 100-кратный фосфатно-солевой буфер концентрированного раствора –

Состав: натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-ти водный - 115,0 г, "хч" ГОСТ 4172-76 натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-х водный - 19,8 г, "чда ", ГОСТ 245-76; натрий хлористый - 87,0 г, "хч", ГОСТ 4233-77; вода для инъекций до 1000 мл; коррекцию pH до значения 7,4±0,2 проводят 1М р-ом едкого натрия "чда" ГОСТ 4328-77, или 1 М раствором соляной кислоты, "хч" ГОСТ 3118-77. Раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм – прозрачная бесцветная жидкость, в которой допускается выпадение кристаллов белого цвета, растворимых в течение 20 – 30 минут при температуре 37±1, pH от 7,2 до 7,6.; Хранят при температуре 24±2 °С до 1 года.

КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор 0,01М;

Приготовление рабочих растворов:

- **ФСБ** – фосфатно-солевой буферный раствор – ФСБ$_{\mathbf{x100}}$ разводят до 1л водой для инъекций. Хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 сут;

- Промывочный раствор (**ФСБ-Т**) – во флакон с 500 мкл Твина-20 добавляют 5,0 мл рабочего раствора ФСБ и смесь осторожно перемешивают до получения однородного раствора, не допуская образования обильной пены. Полученный раствор переносят пипеткой в оставшийся объем (985 мл) рабочего раствора ФСБ. Хранят при температуре от 2 до 8 ^{o}С в течение 4 сут.

- **ИФА-буфер** (ФСБ + 0,1% БСА + 0,01% Твин-20 – к 100 мл раствора ФСБ-Т добавляют 100 мг БСА и, не встряхивая, оставляют при комнатной температуре до полного растворения белка. Раствор предназначен для титрования антигенов и разведения конъюгата. Хранение при температуре от 2 до 8 ^{o}С в течение 4 сут.

- 2% БСА – ФСБ$_{x100}$ разводят до 100мл водой для инъекций, добавляют 2 г БСА и, не встряхивая, оставляют при комнатной температуре до полного растворения белка. Раствор предназначен для внесения в лунки планшета после сенсибилизации иммуноглобулинами. Хранят при температуре от 2 до 8 ^{o}С в течение 2 сут или при минус 18±2 ^{o}С до 1 года.

- **КББ** - карбонатно-бикарбонатный буферный раствор (0,01М):

1,59 г натрия двукислого (Na2CO3) и 2,93 г натрия углекислого кислого (NaHCO3) растворяют в 1 л дистиллированной воды. При необходимости pH раствора доводят до (9,6 ± 0,1) с помощью 1 Н едкого натра. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 ^{o}С в течение 1 сут. или при минус 18 ± 2 ^{o}С 6 мес.

- **ИГ$^{+}$** и **ИГ$^{-}$** - Рабочие разведения доводят до концентрации 10 мкг/мл на КББ перед употреблением;

- **Коньюгат** - Рабочее разведение 1/320, доводят на ИФА-буфере перед употреблением;

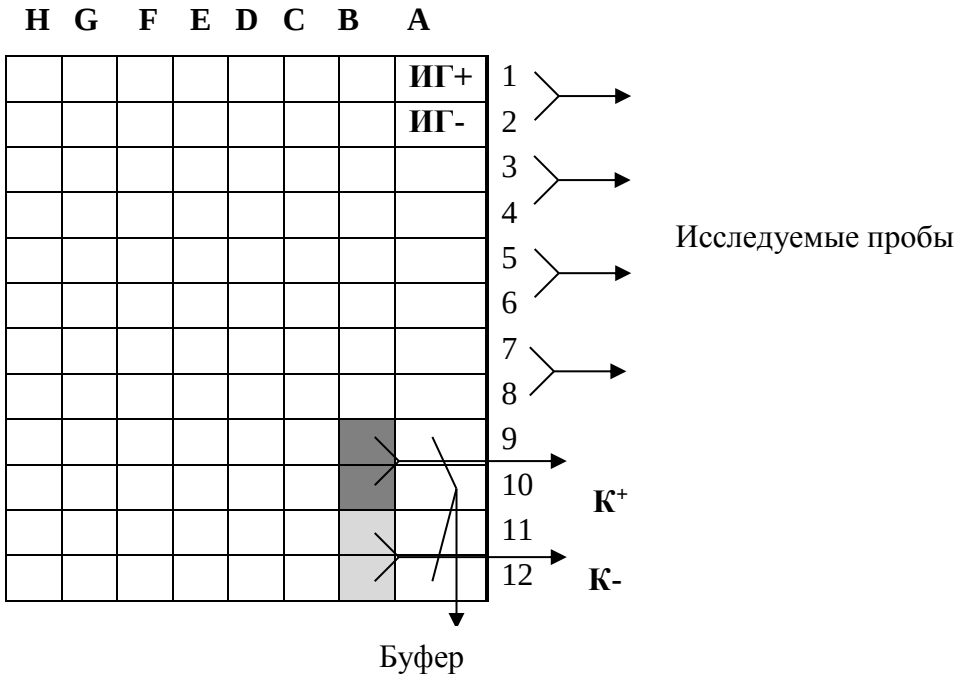
- **Стоп-реагент** - 2М раствор серной кислоты: получают путем постепенного добавления при интенсивном перемешивании 200 мл концентрированной серной кислоты к 1600 мл

дистиллированной воды.

Проведение исследования

Сенсибилизация лунок планшета: планшет располагают согласно схеме (см. ниже).

Вносят по 100 мкл рабочего разведения ИГ$^{+}$ в нечетные ряды лунок и по 100 мкл рабочего разведения ИГ$^{–}$ в четные ряды лунок. Планшет накрывают крышкой и инкубируют 18 часов при температуре 6 ± 2 °С, после чего во все лунки добавляют по 100 мкл 2% БСА и оставляют на 1 час при комнатной температуре (от 15 до 25°С).



Промывка. Содержимое лунок вытряхивают, панель постукивают по нескольким слоям фильтровальной бумаги (в положении вверх дном) для удаления остатков иммуносорбента. Лунки планшета промывают 5 раз по 5 мин ФСБ-Т с помощью аппарата «Washer Bio-Rad».

Внесение антигена. Двукратные разведения с 1:64 до 1:4096 исследуемых образцов вакцины готовят в лунках вспомогательного планшета, используя ИФА-буфер. Каждое разведение исследуемого препарата вакцины вносят по 100 мкл в лунки с ИГ$^{+}$ и ИГ$^{–}$. Параллельно с разведениями исследуемого препарата вносят по 100 мкл положительный и отрицательный контроли. Панель накрывают крышкой и инкубируют 2 час. При (+) 37º С или 18 час. при (+) 4-8º С во влажной атмосфере.

Промывка. Содержимое лунок удаляют, 5 раз по 5 мин ФСБ-Т с помощью аппарата «Washer Bio-Rad», как описано выше.

Внесение конъюгата. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл коньюгат (мышиные мАТ А4, меченные пероксидазой хрена) в рабочем разведении. Панель накрывают крышкой и инкубируют 1 час при температуре 37 ºС во влажной атмосфере.

Промывка. Содержимое лунок удаляют, промывают 5 раз по 5 мин ФСБ-Т с помощью аппарата «Washer Bio-Rad», как описано выше.

Субстат-индикаторную систему (ТМВ) вносят по 100 мкл в каждую лунку. Панель инкубируют в темноте при комнатной температуре (от 15 до 25 °С) в течение 10 - 15 минут.

Остановка реакции: в каждую лунку добавляют 50 мкл реагента (2М серная кислота).

Результаты

Критерии достоверности результатов:

- Результат определения специфических хантавирусных антигенов учитывается, если в лунке **К**$^{+}$ индекс P/N ≥ 2,1, а в лунке **К**$^{-}$ P/N ≤ 2,1.

Учет результатов проводят сразу (не позднее 10 мин.) в ИФА-ридере (любая доступная модель) при длине волны 450 нм.

Положительными считают те образцы, для которых показатель оптической плотности в лунке с ИГ$^{+}$ превышает показатель оптической плотности с ИГ$^{-}$ в 2,1 (индекс P/N).

Титром антигена считается величина, соответствующая наибольшему разведению антигена (индекс P/N ≥ 2,1).

2.1.5.6. Контроль полноты сорбции инактивированного вируса на гидроокиси алюминия

Для определения полноты сорбции инактивированного вируса на гидроокиси алюминия используется иммуноферментный метод определения N белка (**2.1.5.5.**).

Контроль проводят на этапе готовой вакцины.

Определяют титр антигена (N белка) вирусов ПУУ, ХТН, СОЧИ в жидкой фазе готовой вакцины после осаждения гидроокиси алюминия. Полученный результат сравнивают с результатом определения N белка этих вирусов в вакцинном препарате до сорбции на гидроокиси алюминия.

Требования нормативной документации

Полнота сорбции инактивированных вирусов Пуумала, Хантаан, Сочи должна составлять от 80 до 100%.

2.1.6 Исследования острой токсичности

В исследовании использовали животных обоего пола с регламентированной массой:

- морские свинки половозрелые массой 400-500 г, возраст 3,5 -5 мес;
- морские свинки неполовозрелые массой 250 - 300 г, возраст 31-90 дней;
- лабораторные белые мыши беспородные половозрелые с массой 18-20 г.

Установление токсической, максимально переносимой и летальной доз вакцины. Использовали максимально переносимые дозы исследуемого препарата с учетом объема препарата, который может быть безопасно введен испытуемому животному.

Лекарственную форму вводили животным многократно внутримышечно с интервалами в 1 час на протяжении 5 часов в обе задние лапы. В соответствии с Руководством по проведению доклинических испытаний лекарственных средств [4] при изучении общей токсичности рекомендуется использовать максимальную дозу препарата для данного вида животного, способную индуцировать иммунный ответ, который определяется по наибольшему уровню специфических антител. Дозы, выбранные для изучения острой токсичности представлены в Таблице 5.

Таблица 5 - Характеристика исследуемых групп аутбредных мышей и морских свинок

Группа животных, весовая категория	Способ и доза введения		Число животных в группе	
	внутримышечно (в/м)	внутривенно (в/в)	m	f
Морские свинки неполовозрелые 250 – 300 г	по 0,25 мл в обе задние лапы каждый час в течение 5 часов суммарная доза – 2,5 мл	не исследовали	5	5
Морские свинки половозрелые 450 – 500 г	по 0,5 мл в обе задние лапы каждый час в течение 5 часов суммарная доза – 5 мл	1 мл в бедренную вену*	5	5
Мыши неполовозрелые 7 – 8 г	по 0,1 мл в обе задние лапы каждый час в течение 5 часов суммарная доза – 1 мл	не исследовали	5	5
Мыши половозрелые 18 – 20 г	по 0,25 мл в обе задние лапы каждый час в течение 5 часов суммарная доза – 2,5 мл	1 мл в хвостовую вену*	5	5

***** для внутривенного введения использовали вакцинный препарат не сорбированный на гидроокись алюминия

Период наблюдения составлял 14 суток. На протяжении этого времени осуществлялся ежедневный осмотр животных в клетке содержания, на руках и на открытой площадке, оценивалось их общее состояние. На 2-й, 7-й и 15-й день исследования проводилось взвешивание животных. Ежедневно визуально оценивали отклонения в потреблении корма и воды животными. Для оценки возможного нейротоксического действия препарата проводился анализ индивидуального поведения и неврологического статуса до начала исследования и на 14-й день после введения препаратов. Ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус животных изучали на 14-й день исследования для регистрации отсроченных влияний.

Поскольку гибели животных зарегистрировано не было и при вскрытии не было обнаружено каких-либо изменений внутренних органов, связанных с возможной

интоксикацией, микроскопический анализ органов и тканей лабораторных животных не проводился.

2.1.7 Исследование хронической токсичности

В исследовании использовали аутбредных мышей и морских свинок обоего пола с регламентированной массой:

- морские свинки половозрелые массой 400 - 500 г, возраст 3,5 - 5 мес.;
- морские свинки неполовозрелые массой 250 - 300 г, возраст 31 - 90 дней;
- лабораторные белые мыши беспородные половозрелые с массой 18 - 20 г.

Исследуемая вакцина и контроль вводились животным внутримышечно в соответствии с предполагаемым клиническим применением на людях. Дизайн данного исследования предполагал проведение жесткого контроля на хроническую токсичность посредством введения вакцины половозрелым мышам в объёме 0,1 мл внутримышечно ежедневно на протяжении 21 дня, что составило 2,5 дозы на одно животное. Половозрелым морским свинкам вводили по 0,5 мл внутримышечно ежедневно на протяжении 21 дня, что составило 10,5 доз вакцины. При этом учитывали отсутствие токсических эффектов при остром (в течение 5 часов) введении 5 мл вакцины половозрелым морским свинкам и 2,5 мл половозрелым лабораторным мышам.

Установление безопасности вакцины ГЛПС-Вак при длительном хроническом применении половозрелым и неполовозрелым животным.

Характеристика исследуемых групп представлена в таблице 6. Общее количество животных в эксперименте составляло 120 экземпляров. Дизайн исследования представлен в Таблице 7.

Препараты вводились внутримышечно в течение 21 дня половозрелым животным и в течение 14 дней неполовозрелым в объемах, не превышающих допустимые для лабораторных животных данного вида и возраста.

На протяжении этого времени осуществлялся ежедневный осмотр животных в клетке содержания, на руках и на открытой площадке, оценивалось их общее состояние. На 7-й и 14-й и 21-й день после последней инъекции проводилось взвешивание животных. На 30 день брали кровь для гематологических и биохимических исследований. Эвтаназии подвергались все животные из групп 1, 2, 3, 4 на 42-й день эксперимента и из групп 5, 6 на 35-й день эксперимента.

Таблица 6 - Характеристика исследуемых групп при изучении хронической токсичности

Номер группы п/п	Количество животных		Препарат	Количество доз вакцины*	Объем введения препарата х кратность	День эвтаназии
	m	f				
Мыши аутбредные						На 42-й день эксперимента
1	10	10	Контроль (физ. р-р)	0	по 0,1 мл х 21 день, суммарно 2,1 мл	
2	10	10	ГЛПС-Вак	2,1	по 0,1 мл х 21 день, суммарно 2,1 мл	
Морские свинки половозрелые						
3	10	10	Контроль (физ. р-р)	0	по 0,5 мл х 21 день, суммарно 10,5 мл	
4	10	10	ГЛПС-Вак	10,5	по 0,5 мл х 21 день, суммарно 10,5 мл	
Морские свинки неполовозрелые						На 35-й день эксперимента
5	10	10	Контроль (физ. р-р)	0	по 0,25 мл х 14 дней, суммарно 3,5 мл	
6	10	10	ГЛПС-Вак	3,5	по 0,25 мл х 14 дней, суммарно 3,5 мл	

*Введение препаратов внутримышечно, в соответствии с клиническим применением вакцины.

Таблица 7 - Дизайн исследования

Показатели (половозрелые животные)	Дни					
	0	1-21	28	30	36	42
Взвешивание						
Введение препаратов						
Клинический осмотр						
Забор крови						
Оценка индивидуального поведения						
Эвтаназия животных						
Показатели (неполовозрелые животные)	Дни					
	0	1-14	21	30	28	36
Взвешивание						
Введение препаратов						
Клинический осмотр						
Забор крови						
Оценка индивидуального поведения						
Эвтаназия животных						

Массу тела регистрировали непосредственно перед введением и после окончания введения препаратов на 7-е сутки, 14-е и 21 сутки непосредственно перед эвтаназией для расчета процентного отношения массы органов к массе тела. Клиническое наблюдение за животными в клетках содержания, с целью выявления признаков патологии и смертности,

производили ежедневно. Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус животных изучали до введения препаратов, на 7-й, 14-й и 21-й день после введения препаратов для регистрации влияния многократного введения и после отмены препарата.

Методы оценки поведения мышей в «открытом поле» «приподнятом крестообразном лабиринте - ПКЛ» были идентичными с теми, что использовались при проведении исследования острой токсичности.

Гематологические показатели определяли на гематологическом анализаторе в цельной крови с антикоагулянтом: гемоглобин, г/дл., гематокрит, %, эритроциты, 10^{12}/л, лейкоциты, 10^{9}/л, гранулоциты, %, MID (моноциты, эозинофилы, базофилы), %, лимфоциты, %, тромбоциты, 10^{9}/л, СОЭ.

Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов. Перечень органов, подлежавших взвешиванию: сердце, легкие с трахеей, печень, поджелудочная железа, селезенка, почки, надпочечники, головной мозг.

Процедуру взвешивания осуществляли на электронных весах. Массовые коэффициенты органов определяли у животных всех экспериментальных групп.

Перечень органов, подлежавших макроскопическому исследованию: лимфатические узлы, молочные железы — самки, аорта, сердце, гортань, трахея, легкие с трахеей (два), тимус, пищевод, желудок (железистый и агранулярный отделы), тонкий отдел кишечника, толстый отдел кишечника, печень (две доли), поджелудочная железа, селезенка, почки (две), надпочечники, мочевой пузырь, матка (оба рога и шейка) — самки, яички вместе с эпидидимусами (два) — самцы, яичники (два) — самки, подчелюстная слюнная железа с лимфатическими узлами, щитовидная/паращитовидная железа, головной мозг (3 отдела: передний, средний и задний), мышца задней конечности (место введения).

Перечень органов, подлежавших гистологическому исследованию: сердце, легкие с трахеей, тимус, печень, поджелудочная железа, селезенка, почки, надпочечники, паховые узлы, головной мозг. Образцы указанных тканей вырезали, фиксировали в 10% формалине, пропитывали парафином, приготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону и исследовали световой микроскопией. Остатки тканей сохраняли в фиксаторе [14].

2.1.8 Исследование аллергизирующих свойств

Эксперименты проведены на морских свинках обоего пола. Выбор морских свинок в

качестве экспериментальной модели базируется на основании их высокой реактогенности по отношению каким-либо аллергенам [15].

Характеристика животных, используемых для изучения аллергизирующих свойств вакцины:

1) Тест конъюктивальная проба – морские свинки массой 450 - 550 г по 5 самок и самцов.

2) Реакция гиперчувствительности «замедленного» типа на половозрелых морских свинках – массой 450 - 550 г по 10 самок и самцов.

В тесте общей анафилаксии был использован внутримышечный путь введения, который планируются для применения и в клинической практике. Сенсибилизирующая доза исследуемого средства в тесте «реакция общей анафилаксии» была введена внутримышечно, разрешающая – внутрисердечно. Морским свинкам вводили вакцину в одной и трех прививочных для человека дозах в течение 3 дней. В каждой группе было представлено по 10 животных.

Постановка теста «конъюнктивальная проба».

Считается, что «конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом и в ряде случаев позволяет выявить реакцию животных на аллерген при слабой аллергизации и отрицательных кожных тестах» [15], и с этой точки зрения отрицательные результаты конъюктивальной пробы служат доказательством того, что и накожные аппликации вакцины не вызовут аллергических реакций.

Главным условием для выбора разрешающей дозы является отсутствие раздражения после закапывания тестируемых веществ. Морским свинкам закапывали под верхнее веко одного глаза по 0,1 мл испытуемой вакцины. Каждому животному под верхнее веко другого глаза закапывали такой же объем физиологического раствора (контроль). Реакцию учитывали через 15 мин после закапывания, через 24 часа и 48 часов [15].

Оценку результатов проводили по следующей шкале (в баллах):

0 - отсутствие реакции;

1 - легкое покраснение слезного протока;

2 - покраснение слезного протока и склеры в направление к роговице;

3 - покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Тест «Реакция общей анафилаксии». Тестируемые вещества и плацебо (1 и 3 дозы) вводили животным на 1, 2 и 3 дни исследования с целью сенсибилизации организма внутримышечно в область бедра. На 21 день исследования опытным и контрольным животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу тестируемых веществ. Оценку

результатов проводили с помощью индекса Weigle [14], который отражает интенсивность анафилактического шока:

++++ — шок со смертельным исходом

+++ — шок тяжелой степени (общие судороги, асфиксия, животное теряет способность удерживаться на лапах, падает на бок, не погибает)

++ — шок умеренный (небольшие судороги, выраженные явления бронхо-спазма)

+ — шок слабый (некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, шерсть взъерошена)

0 — шок не развился, признаки его отсутствуют

2.1.9 Исследование иммунотоксических свойств

Характеристика животных, используемых для изучения иммунотоксических свойств вакцины ГЛПС-Вак, представлена в Таблице 8.

Таблица 8 - Характеристика животных для проведения иммунотоксичности

Вид животных:	Мыши линии CBA (половозрелые)
Вес животных к началу исследования:	18-22 г
Количество (самки и самцы)	40
Вид животных:	Мыши линии CBA (неполовозрелые)
Вес животных к началу исследования:	8-10 г
Возраст животных:	2 недели
Количество (самки и самцы)	40

Для определения влияния вакцин на гуморальный иммунный ответ использовали определение титра антител к эритроцитам барана (ЭБ) в опытных и контрольных группах мышей обоего пола, которым вводили вакцины [17]. В испытуемых группах вакцину однократно вводили мышам внутримышечно 0,5 мл взрослым и 0,25 неполовозрелым в оба бедра. В контрольной группе мышам аналогично вводили физиологический раствор. Одновременно мышам внутрибрюшинно ввели по 0,5 мл взвеси эритроцитов барана (ЭБ) 3 % (в физиологическом растворе). На 8 сутки провели забор крови (пик выработки антител в организме на 7 - 10 сутки). Сыворотку крови прогрели при температуре 56 ^{0}C в течение 30 минут для инактивации комплемента. Сыворотки крови разводили в соотношении 1:5. Для определения титра гемагглютининов использовали микромодификацию реакции гемагглютинации с помощью микротитратора Такачи производства фирмы MOM (Венгрия) [17]. Дозатором микротитратора вносили 25 мкл сыворотки в разведении 1:5 в 1 и 2 лунку, где, как и во всех последующих лунках (с 2 по 12) каждого ряда микропланшеты, заранее были внесены 25 мкл 1% нормальной кроличьей сыворотки на 0.15 М NaCl. Затем с

помощью устройства для разведения на 25 мкл микротитратора сыворотку перемешивали и переносили 25 мкл во вторую лунку этого ряда и так далее до 11 лунки включительно. Лунка 12 служила контролем, где была только 1% нормальная кроличья сыворотка. После разведения сыворотки получали ряд двукратных разведений, начиная от 1:5, 1:10 и т.д. Затем во все лунки вносили 25 мкл 0,5% взвеси ЭБ на 1% нормальной кроличьей сыворотке. Планшеты встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 1 час. За это время реакция заканчивалась и в контроле с 1% кроличьей сывороткой формировался осадок, что свидетельствовало об отрицательной реакции в данной лунке. В опытных лунках определяли титр антител, т.е. наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация эритроцитов. Титр сыворотки выражали в виде обратной величины титра или в log по основанию 2. Критерием оценки реакции являлось изменение концентрации антител по сравнению с контролем. Если индекс реакции (ИР) = 0,5 и ниже, то препарат угнетает антителогенез, если выше 1,3 – обладает стимулирующим эффектом [17].

Влияние вакцины ГЛПС-Вак на Т-клеточный иммунитет in vivo оценивали у мышей по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана. Для испытания использовали мышей обоего пола, которых распределили по группам по 10 голов в каждой группе. В испытуемых группах вакцину однократно вводили внутримышечно по 1/2 прививочной дозе, т.е. по 0,5 мл - взрослым мышам (по 0,25 мл в каждое бедро), по 0,25 мл (по 0,125 мл в каждое бедро) неполовозрелым мышам. В контрольной группе мышам аналогично вводили физиологический раствор. Одновременно мышам внутрибрюшинно ввели по 0,5 мл 3 % взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе. На 5 сутки мышам всех групп в подушечки задних правых лап ввели разрешающую дозу взвеси эритроцитов барана 10 % (в физиологическом растворе) в объеме 0,02 мл. В контралатеральную лапу вводили в таком же объеме воду для инъекций. Через 24 часа оценивали изменения масс инъецированных конечностей мышей и определяли сдвиг воспаления (ИВ - индекс воспаления) [17].

ИВ вычисляли по формуле: ИВ = $[(M_o – M_k) : M_k]$ x 100 %, где

- M_o – масса испытуемой лапы, мг;
- M_k – масса контрольной лапы, мг.

2.1.10. Исследование эмбриотоксического действия

Исследование эмбриотоксического действия вакцин было проведено в 2 этапа. На первом этапе производилась оценка действия вакцин в пренатальный период, на втором этапе – постнатальные проявления их действия. Исследования проводились на

нелинейных белых крысах – самках весом 180 - 200 г, находящихся на стандартном рационе. Спаривание виргинных самок осуществлялось с интактными самцами. Первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. На протяжении всего эксперимента производилось ежедневное наблюдение за состоянием животных: осмотр, взвешивание, регистрация среднего потребления воды и пищи [18].

Изучение эмбрио– и фетотоксического действия вакцины ГЛПС-Вак, регистрируемого в антенатальном периоде развития.

Схема испытания.

При внутримышечном введении:

2 группы (опытная и контрольная по 15 беременных самок). Всего 30 крыс, массой 140 - 160 г.

1 группа (опытная) — в/м вводят 0,5 прививочной дозы для человека (0,5 мл) ГЛПС-Вак в течение 19 дней.

2 группа (контрольная*)* — в/м вводят контрольный препарат (физиологический раствор NaCl) в объеме0,5 мл в течение 19 дней.

При подкожном введении:

2 группы (опытная и контрольная по 15 беременных самок). Всего 30 крыс, массой 140-160 г.

1-я группа (опытная) — п/к вводят 0,5 прививочной дозы для человека (0,5 мл) ГЛПС-Вак в течение 19 дней.

2-я группа (контрольная) — п/к вводят контрольный препарат (физиологический раствор NaCl) в объеме 0,5 мл в течение 19 дней.

Вскрытие самок осуществлялось на 20 день беременности, при этом определяли количество желтых тел в яичниках, подсчитывали количество мест имплантации, резорбции и живых плодов. Каждый плод подвергался внешнему осмотру и взвешиванию. Одну треть плодов из каждого помета фиксировали в смеси Буэна для последующего изучения внутренних органов, остальные животные из каждого помета фиксировались в 96% спирте для изучения в дальнейшем состояния костного скелета. Внутренние органы исследовались по методу Вильсона в модификации НИИЭМ АМН СССР [18]. Костная ткань изучалась по методу Даусона в модификации ОЭ НИИЭМ АМН СССР [19].

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием t-критерия Стъюдента и критерия U Уилкоксона-Манна-Уитни [14].

Изучение антенатального повреждающего действия вакцины в постнатальном периоде развития. На следующем этапе экспериментального исследования вакцины в/м введение осуществлялось с 1 по 20 день беременности в тех же дозах. Контрольным животным вводили физиологический раствор. В каждой группе было получено потомство от 15 самок. После родов

в каждом помете оставляли не более 8 крысят для дальнейшего изучения физического развития потомства, скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, исследования эмоционально-двигательного поведения крысят после окончания периода вскармливания [18].

Схема испытаний.

При внутримышечном введении:

2 группы (опытная и контрольная по 15 беременных самок). Всего 30 крыс массой 140 - 160 г.

1 группа (опытная) — в/м вводят 0,5 прививочной дозы для человека (0,5 мл) Вакцины ГЛПС с 1 по 20 день беременности.

2 группа (контрольная) — в/м вводят контрольный препарат (физиологический раствор NaCl) в объеме 0,5 мл в течение 20 дней.

При подкожном введении:

2 группы (опытная и контрольная по 15 беременных самок). Всего 30 крыс массой 140 - 160 г.

1 группа (опытная) — п/к вводят 0,5 прививочной дозы Вакцины ГЛПС в течение с 1 по 20 день беременности.

2 группа (контрольная) — п/к вводят контрольный препарат (физиологический раствор NaCl) в объеме 0,5 мл с 1 по 20 день беременности.

Исследование начинали через 24 часа после рождения и продолжали до 2-месячного возраста. Оценка включает следующие типы исследований: наблюдение за физическим развитием потомства, изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, изучение двигательного и эмоционального поведения и способности к координации движений у потомства. Изучение формирования рефлекса потомства крыс и эмоционально-двигательное поведение потомства в тесте «открытое поле» проводилось только на потомстве крыс, получавших вакцину и контрольный препарат при внутримышечном введении в прививочной дозе для человека, т.к. испытуемый препарат, вакцина ГЛПС-Вак, предназначен только для внутримышечного введения.

При изучении физического развития потомства регистрировали размер помета, число живых и мертвых новорожденных, число особей разного пола, массу тела крысят на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после рождения, а также сроки отлипания ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускания семенников и открытия влагалища [18].

Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания проводили с использованием следующих тестов: переворачивание на плоскости (2 - 4 дни), отрицательный геотаксис (5 - 6 дни), избегание обрыва (4 - 6 дни).

Опыты проводились 1 раз в день в одно и то же время до полного формирования рефлексов по указанным тестам.

Переворачивание на плоскости. Крысят клали на спину на плоскую поверхность, после чего отпускали и измеряли время, необходимое для возвращения в нормальное положение. Формирование рефлекса считали завершенным, если крысенок возвращался в исходное положение на все четыре лапы на 8-й день эксперимента.

Отрицательный геотаксис. Крысят помещали на наклонную плоскость (25°) головой вниз. Рефлекс считали сформированным, если крысята поворачивались на 180° на 7 день исследования. Исследование проводили 1 раз в день по 1 минуте.

Избегание обрыва. Крысят клали на стол таким образом, что передние лапы касались края стола. Рефлекс считали завершенным, если крысята отползали от края стола в течение 10 секунд на 9-й день эксперимента.

В возрасте 14 дней у потомства изучали эмоционально-двигательное поведение с использованием теста «открытое поле». Тестированию подверглись 10 пометов из каждой группы. Методы оценки поведения мышей в «открытом поле» были идентичными с теми, что использовались при проведении исследования острой токсичности.

2.1.11. Исследование влияния на репродуктивную функцию

Исследование влияния вакцины на репродуктивную функцию было проведено на нелинейных белых крысах массой 180 - 200 г. Каждая группа состояла из 20 самцов и 40 самок. Наблюдение и оценку состояния животных проводили ежедневно: осмотр регистрация среднего потребления воды и пищи, один раз в неделю животных взвешивали. Введение вакцины производилось в/м в 1 прививочной дозе. Контрольным животным вводили физиологический раствор. В каждой группе было по 20 самцов и 40 самок.

Введение вакцины или физиологического раствора осуществлялось самцам в течение 60 дней до спаривания с интактными самками. Самкам вакцину или физиологический раствор вводили в течение 15 дней до спаривания с интактными самцами.

1 группа (контрольная) — 20 самцов, физиологический раствор 60 дней;

2 группа (опытная) — 20 самцов, вакцина 60 дней;

3 группа (контрольная) — 40 самок, физиологический раствор 15 дней;

4 группа (опытная) — 40 самок, вакцина 15 дней;

После окончания введения самки подсаживались к интактным самцам, а интактные самки к опытным самцам в соотношении 2:1 сроком на 2 эстральных цикла (10 дней).

Половину самок вскрывали на 19 - 20 дни беременности, подсчитывали количество

желтых тел, мест имплантации, количество живых и погибших плодов. Вторую половину самок оставляли до родов и проводили наблюдение за течением родов и физическим развитием потомства в период вскармливания [18].

Индекс беременности рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Индекс беременности} = \frac{\text{Число беременных самок}}{\text{Число самок, посаженных к самцам}} \times 100\%.$$

За единицу наблюдения при статистической обработке полученных результатов принимали одну самку или один помет. Наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья проводили непосредственно перед введением вещества. Осматривали внешний вид животных, находящихся в клетке, поведение каждого поведение (активность – повышенная или пониженная), походку (мышечный тонус, тремор, балансирование), темперамент (вялость, возбудимость, агрессивность); внешний вид (истощение, ожирение), состояние шерстяного покрова (выпадение шерсти, шерсть торчащая, пятнистая, тусклая, гладкая, блестящая), глаза (слезотечение, воспаление, помутнение роговицы), уши (воспаление, цвет – бледность или покраснение, выделение секрета, чувствительность, подергивание), конечности (цвет, отек), зубы (цвет, выпадение) [18].

2.1.12 Исследование мутагенных свойств в тесте Эймса

Исследования по обнаружению мутагенных свойств вакцины проводили с помощью коммерческого набора Muta-ChromoPlate Kit (Ames Test Kit) согласно инструкции.

Достоверность различий определена по критерию Стьюдента при уровне значимости $p<0,05$.

2.1.13 Исследование иммуногенности и стабильности вакцины

Исследования иммуногенности готовой вакцины ГЛПС-Вак были проведены на нулевом сроке хранения и далее через 6, 12 и 24 месяцев и 2г и 8 мес хранения в регламентированных условиях. Испытание иммуногенной активности проводилось на мышах BALB/c с последующим определением антител в сыворотках крови иммунизированных животных в реакции нейтрализации по редукции числа ФОЕ в культуре клеток Vero E6.

Иммунизация животных. Мыши BALB/c (самки и самцы) массой 18 - 20 г, возраст 8 -9 недель были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой: группа для оценки вакцины в разведении 1:2, для разведения вакцины 1:8, для разведения вакцины 1:32 и группа контроля (вводится физиологический раствор с гидроксидом алюминия в той же

концентрации, что и в вакцинном препарате). Вакцина в нативном виде или в разведениях (физиологическим раствором NaCl) вводилась трехкратно с 2-х недельным интервалом по (0,5 мл для взрослых и 0,25 мл для неполовозрелых) внутримышечно в бедренную мышцу задней конечности. Забор крови осуществлялся через 2 недели после 3-й иммунизации. Сыворотки крови отбирали в чистые пробирки, инкубировали в течение 30 мин при температуре 56 °С и хранили до проведения контролей при температуре (6±2) ºС.

Иммуногенность вакцины определяли по регистрации нейтрализующих антител к хантавирусам Пуумала, Хантаан и Сочи. Нейтрализующие антитела в сыворотках крови иммунизированных мышей определяли методом редукции числа фокус образующих единиц (2.1.5.2.).

Исследование стабильности вакцины по неспецифическим показателям. Исследования проводили через 12, 24 и 32 месяца хранения вакцины в регламентированных условиях. Для определения характеристик вакцины по неспецифическим показателям брали 40 ампул методом случайной выборки.

Контроли физико-химических показателей, стерильности, аномальной токсичности и пирогенности осуществляли в соответствии с методами контроля, утвержденными Государственной фармакопеей, издание 13.

2.1.14 Методы статистической обработки результатов исследований

Статистический анализ результатов токсикологических исследований вакцины выполнен с помощью программы Statistica 6.0. Уровень статистической значимости различий между выборками оценивали с помощью критериев Манна Уитни.содержания Полученные результаты представлены в виде M ± m, где M – среднегеометрическое значение титра нейтрализующих антител, m – стандартная ошибка среднего. Достоверность различий выборочных совокупностей оценивались по критериям Стьюдента-Фишера и Вилкоксона. Достоверность их корреляции определялась по коэффициенту корреляции.

Результаты исследования иммуногенной стабильности вакцины были проанализированы в программе GraphPad Prism версии 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка. Статистическая значимость указывается как ns = несущественно, *$p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Глава 3 Основные технологические этапы изготовления вакцины ГЛПС-Вак

3.1 Производство и методы контроля

Схемы основных этапов производства вакцины ГЛПС-Вак представлены на рисунках 1 и 2.

На рисунке 2 схематично представлены основные этапы производства вакцины ГЛПС-Вак. Для конструирования трехвалентной вакцины использовали следующие методологические приёмы: методы культивирования перевиваемых культур клеток, методы концентрирования и очистки вирусов из культуральной жидкости (стерилизующая фильтрация, тангенциальная ультрафильтрация - концентрирование), хроматографическая очистка вируссодержащего концентрата на колонках с Sepharose 6FF (гель-фильтрация), инактивация формальдегидом, которые были ранее отработаны в процессе изготовления моновалентой вакцины Пуумала и бивалентной вакцины на основе вирусов Пуумала и Куркино [12]. Экспериментальные серии поливалентной вакцины для проведения контролей на безопасность и иммуногенную активность приготовлены совместно с научными сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок С.С. Курашовой, к.б.н. М.С. Егоровой, к.б.н. М.В.Баловневой.

Рисунок 1 – Основные этапы изготовление вакцины ГЛПС-Вак.

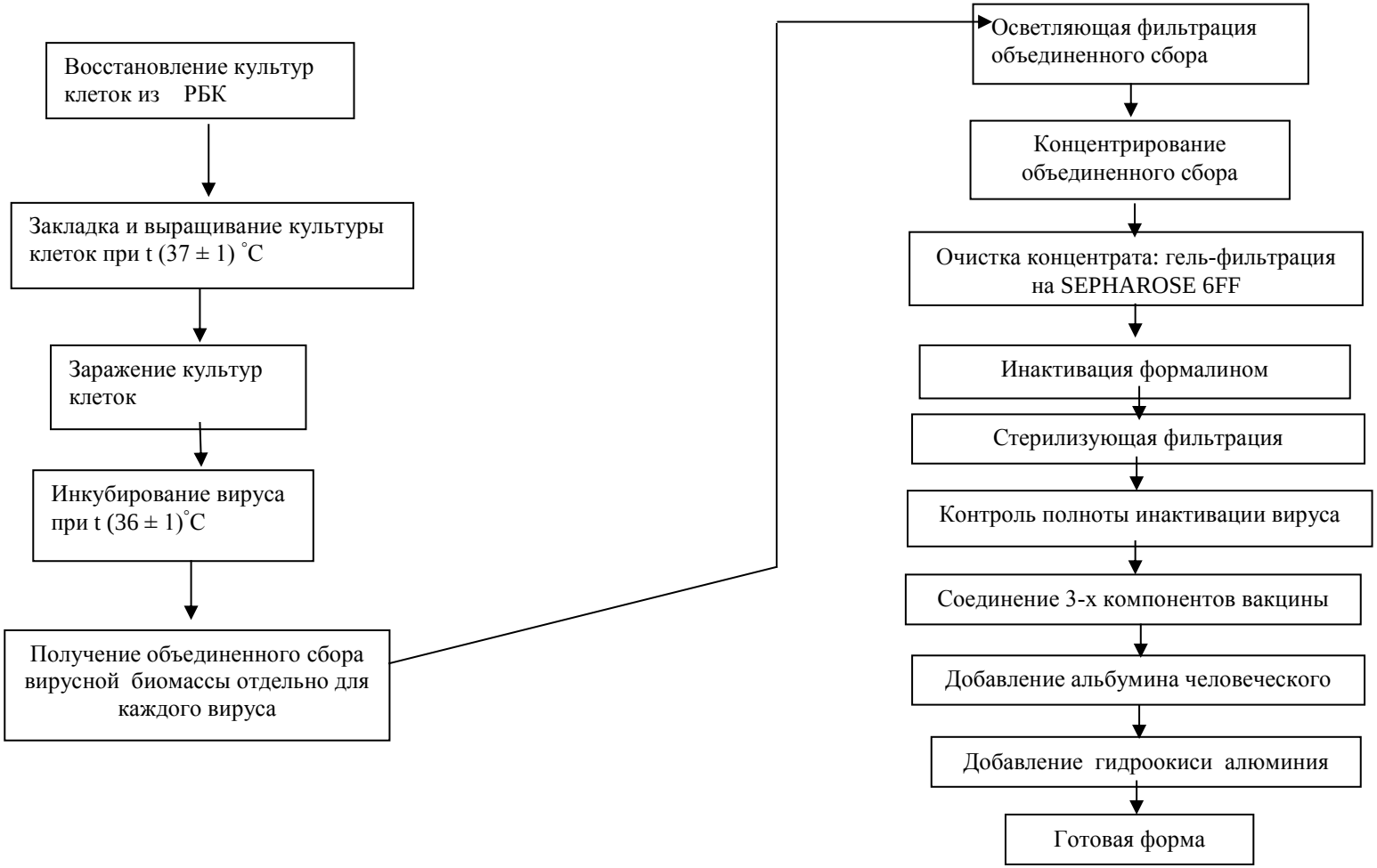


Рисунок 2 – Биологическая схема производства вакцины ГЛПС-Вак

3.1.1 Накопление вируссодержащего материала

Для заражения использовали посевной вирус. Множественность заражения клеток составляла для каждого вируса 0,02-0,1 ФОЕ/кл. В расчете на пятьдесят 1 литровых роллеров готовили клеточную взвесь в объеме 400 мл, содержащую $9x10^8$ клеток в мл. Посевной вирус оттаивали при температуре (18±2)°С, разводили средой Игла МЕМ2 (с двойным набором аминокислот и витаминов) с 5 % сыворотки теленка в объеме 100 мл до концентрации от 3 до 5 на 10^7 ФОЕ/мл. Объединяли 400 мл клеточной взвеси со 100 мл посевного вируса. Полученную вирус-клеточную взвесь инкубировали при температуре (35±1)°С на шейкере в течение 1 часа. Вирус-клеточный субстрат разливали по 10 мл в 1л роллерные бутыли, в которые предварительно внесли по 80 мл ростовой среды (ИМЕМ2 с 5 % сыворотки теленка). На 3 день инкубирования при (37±0,5)°С делали смену среды на поддерживающую (Игла МЕМ без сыворотки). С 5 по 9 сутки делали ежедневные сливы культуральной жидкости с последующим внесением 50 мл на роллерную бутыль свежей среды ИМЕМ.

Сведение партий вируссодержащей культуральной жидкости (отдельно для вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи) проводили на 5,6,7,8,9 сутки одной или нескольких закладок клеток-продуцентов. Использовали только вируссодержащие культуральные жидкости, в которых инфекционный титр вируса составлял не менее 5,0 lg ФОЕ/мл, свободные от бактериальной и грибковой контаминации и микоплазм. Перед объединением партии вируссодержащей культуральной жидкости размораживали путем выдерживания при температуре (18±2)°С. Материал асептично переливали в одну ёмкость для каждого вируса в отдельности. Отбирали пробы на контроль инфекционной активности.

3.1.2 Концентрирование вируссодержащей культуральной жидкости

Концентрирование проводили путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя систему концентрирования с пределом отсечения 100 кДа и площадью фильтрации от 0,1 до 0,5 $м^2$. Ультрафильтрацию проводили при температуре 20 - 24°С и давлении до 2,5 бар. Для предупреждения значительного повышения температуры полуфабриката последний предварительно охлаждали до температуры 6±2°С.

3.1.3 Очистка первичных концентратов вирусов

Для гель-фильтрации использовали колонку с Sepharose 6 Fast Flow производства GE Healthcare, которую уравновешивали трис-буфером (10 мМ Tris-HCl, 130 мМ NaCl; pH 7,2 – 7,4). Затем наносили образец (концентрат) объёмом 15 - 20 мл. Элюировали тем же буфером со скоростью 4 - 6 мл/мин, собирали фракции объёмом 10 мл. Оптическую

плотность (ОП) каждой фракции определяли при длине волны 280. Хранили концентрат при температуре: (6±2) ^{0}С не более 5 дней, при температуре минус (18±2) °С - не более 1 месяца, при температуре минус (70±2) °С – до 1 года.

3.1.4 Инактивирование и контроль на отсутствие живого вируса (специфическая безопасность) моновалентных вакцин против ГЛПС

Очищенный вирус в виде вируссодержащей жидкости (пул фракций после хроматографической очистки, каждый хантавирус в отдельности) подвергали инактивированию формалином. Вируссодержащую жидкость после добавления формалина подвергали стерилизующей фильтрации через мембрану Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Процесс инактивации длился 30 дней при температуре 6 ±2 °С. На 30 день процесс инактивации останавливали: нейтрализовали формальдегид добавлением сульфита натрия (Na_2SO_3) до конечной концентрации 0,0264 М/л. По окончании срока инактивации из каждой бутыли забирали пробы для контроля на специфическую безвредность. В таблице 9 представлены результаты контроля специфической безопасности моновакцинах против ГЛПС (отсутствие живого вируса).

Таблица 9 - Контроль остаточной инфекционности и содержания N антигена в моновакцинах

	Пуумала	**Хантаан**	**Сочи**
До инактивирования			
Титр вируса (lg ФОЕ/мл)	5,4	6,2	5,2
Титр N антигена	1/1024	1/1024	1/512
После инактивирования			
Титр вируса (lg ФОЕ/мл)	0	0	0
Титр N антигена	1/1024	1/1024	1/512

3.1.5 Получение готовой формы вакцины ГЛПС-Вак

Полуфабрикат серии трехвалентной вакцины против ГЛПС получали после сведения равных объёмов полуфабрикатов моновалентных вакцин Пуумала, Хантаан и Сочи в разведениях, содержащих N антиген в титре не менее 1/128 для каждой из моновакцин. В соответствии с описанной технологией были приготовлены 3 экспериментальные серии вакцины ГЛПС-Вак по 600, 650 и 660 доз соответственно. Основные характеристики экспериментальных серий вакцины представлены в Таблице 10.

Таблица 10 - Исследования экспериментальных серий вакцины ГЛПС-Вак на соответствие требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам, вводимым людям *

Показатели	Требования ГФ и проекта НТД	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Описание	Непрозрачная суспензия	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Иммуногенная активность	Титр нейтрализующих АТ к хантавирусам в иммунных сыворотках BALB/c ≥ 1:20	Пуумала – 1:512 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:440	Пуумала – 1:520 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:450	Пуумала – 1:480 Хантаан – 1:465 Сочи – 1:440
Специфическая активность	Титр N антигена не менее 1/256	Соответствует	Соответствует	Соответствует
pH	от 7,0 до 7,6	7,6	7,6	7,6
Бактериальные эндотоксины Пирогенность	Не более 25 ЕЭ Должна быть апирогенна	Менее 25 ЕЭ Апирогенна	Менее 25 ЕЭ Апирогенна	Менее 25 ЕЭ Апирогенна
Аномальная токсичность	Должна быть не токсична	Не токсична	Не токсична	Не токсична
Стерильность	Должна быть стерильна	Стерильна	Стерильна	Стерильна
Микоплазмы	Не должна содержать микоплазм	Не содержит	Не содержит	Не содержит
Формальдегид	Не более 0,01 мг/дозу	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/дозу	1,1 мг/дозу	1,15 мг/доза	1,11 мг/доза
Специфическая безопасность	Не должна содержать живого вируса	Не содержит	Не содержит	Не содержит
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	85 мкг/доза	70 мкг/доза	78 мкг/доза
Остаточная ДНК клеток	Не более 10 нг/доза	< 10 нг/доза	< 10 нг/доза	< 10 нг/доза
Полнота сорбции	От 80 до 100%	99 %	99 %	99 %

* Экспериментальные серии поливалентной вакцины приготовлены и проконтролированы совместно с научными сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок С.С. Курашовой, к.б.н. М.В.Баловневой, к.б.н. М.С. Егоровой, Н.А. Коротиной.

Кроме того, ниже приведены копии паспортов этих же серий вакцины, прошедших контроли в отделе контроля качества ФНЦИРИП им.М.П. Чумакова РАН.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» 108819, Российская Федерация, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1			
Вид: Стандартная заполняемая форма	**Название: Паспорт**	**Форма №: Пс № 06-06-000**	**Версия: 02**
АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ (ЦЕНТРА) **№ РОСС RU.0001.22ФВ11**			

ПАСПОРТ № 1_

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ (ГЛПС-Вак), СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ

Номер серии	*1*	Количество флак. в серии:	***600***
Производственные штаммы	штаммы: ПУУ-ТКД/VERO, депонирован в ГКВ (№1026, 2009 г); ХТН-Р-88/VERO, депонирован в ГКВ (№1283, 2018 г); ДОБ-Сочи/VERO, депонирован в ГКВ (№1282, 2018 г).	Количество пачек серии:	***60***
		Дата выпуска:	***Октябрь 2016 г***
Количество доз в амп./флак:	***1доза/фл***	Годен до:	***Октябрь 2018 г***

ИСПЫТАНИЯ ПРОВЕДЕНЫ В СООТВЕТСТВИИ ЛР 01895065-27-16

№п.	**Наименование показателя**	**Требования** ЛР 01895065-27-16	**Результаты контроля**
1	Описание	Непрозрачная суспензия белого цвета без посторонних включений	Соответствует
2	Время седиментационной устойчивости	Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 минут	Более 3 минут
3	Подлинность	Вакцина должна индуцировать образование нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи при внутримышечной иммунизации экспериментальных животных (BALB/c) в титре ≥ 20	Титр нейтрализующих антител к вирусам: Пуумала – 1:512 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:440
5	Полнота сорбции антигена	От 80 до 100%	99 %
6	Стерильность	Вакцина должна быть стерильной	Стерильна
8	Аномальная токсичность	Вакцина должна быть нетоксичной	Нетоксична
11	Формальдегид	Не более 0,01 мг/доза	Отсутствует
12	Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/доза	1,1 мг/доза
16	pH	От 7,4 до 7,6	7,6
17	Упаковка	Вакцина по *1* дозе во флаконах объемом 5 мл из стекла 1-го гидролитического класса по ИСО 9187. Комплект состоит из 10 фл, содержащих 1 дозу (1 мл) вакцины.	Соответствует
18	Маркировка	В соответствии с ЛР 01895065-27-16	Соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:	Серия № *1* вакцины против ГЛПС культуральной очищенной концентрированной инактивированной соответствует требованиям ЛР 01895065-27-16

« 31 » октября 2016 г. Начальник ОКК: (Гленель Л.В.)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» 108819, Российская Федерация, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1			
Вид: Стандартная заполняемая форма	**Название: Паспорт**	**Форма №: Пс № 06-06-000**	**Версия: 02**
АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ (ЦЕНТРА) **№ РОСС RU.0001.22ФВ11**			

ПАСПОРТ № 2_

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ (ГЛПС-Вак), СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ

Номер серии	*2*	Количество флак. в серии:	***650***
Производственные штаммы	штаммы: ПУУ-ТКД/VERO, депонирован в ГКВ (№1026, 2009 г); XTH-P-88/VERO, депонирован в ГКВ (№1283, 2018 г); ДОБ-Сочи/VERO, депонирован в ГКВ (№1282, 2018 г).	Количество пачек серии:	***65***
		Дата выпуска:	***Октябрь 2016 г***
Количество доз в амп./флак:	***1доза/фл***	Годен до:	***Октябрь 2018 г***

ИСПЫТАНИЯ ПРОВЕДЕНЫ В СООТВЕТСТВИИ ЛР 01895065-27-16

№п.	**Наименование показателя**	**Требования** ЛР 01895065-27-16	**Результаты контроля**
1	Описание	Непрозрачная суспензия белого цвета без посторонних включений	Соответствует
2	Время седиментационной устойчивости	Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 минут	Более 3 минут
3	Подлинность	Вакцина должна индуцировать образование нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи при внутримышечной иммунизации экспериментальных животных (BALB/c) в титре ≥ 20	Титр нейтрализующих антител к вирусам: Пуумала – 1:520 Хантаан – 1:480 Сочи – 1:450
5	Полнота сорбции антигена	От 80 до 100%	99 %
6	Стерильность	Вакцина должна быть стерильной	Стерильна
8	Аномальная токсичность	Вакцина должна быть нетоксичной	Нетоксична
11	Формальдегид	Не более 0,01 мг/доза	Отсутствует
12	Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/доза	1,15 мг/доза
16	pH	От 7,4 до 7,6	7,6
17	Упаковка	Вакцина по *1* дозе во флаконах объемом 5 мл из стекла 1-го гидролитического класса по ИСО 9187. Комплект состоит из 10 фл, содержащих 1 дозу (1 мл) вакцины.	Соответствует
18	Маркировка	В соответствии с ЛР 01895065-27-16	Соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:	Серия № __2__ вакцины против ГЛПС культуральной очищенной концентрированной инактивированной соответствует требованиям ЛР 01895065-27-16

« 31 » октября 2016 г. Начальник ОКК: _____ (Гремль Я.В.)

	ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ **«Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»** **108819, Российская Федерация, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1**

Вид: Стандартная заполняемая форма	**Название: Паспорт**	**Форма №: Пс № 06-06-000**	**Версия: 02**

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ (ЦЕНТРА) **№ РОСС RU.0001.22ФВ11**

ПАСПОРТ № 3_

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ (ГЛПС-Вак), СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ

Номер серии	*3*	Количество флак. в серии:	***660***
Производственные штаммы	штаммы: ПУУ-ТКД/VERO, депонирован в ГКВ (№1026, 2009 г); ХТН-Р-88/VERO, депонирован в ГКВ (№1283, 2018 г); ДОБ-Сочи/VERO, депонирован в ГКВ (№1282, 2018 г).	Количество пачек серии:	***66***
		Дата выпуска:	***Октябрь 2016 г***
Количество доз в амп./флак:	***1доза/фл***	Годен до:	***Октябрь 2018 г***

ИСПЫТАНИЯ ПРОВЕДЕНЫ В СООТВЕТСТВИИ ЛР 01895065-27-16

№п.	**Наименование показателя**	**Требования** ЛР 01895065-27-16	**Результаты контроля**
1	Описание	Непрозрачная суспензия белого цвета без посторонних включений	Соответствует
2	Время седиментационной устойчивости	Суспензия, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 3 минут	Более 3 минут
3	Подлинность	Вакцина должна индуцировать образование нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи при внутримышечной иммунизации экспериментальных животных (BALB/c) в титре ≥ 20	Титр нейтрализующих антител к вирусам: Пуумала – 1:480 Хантаан – 1:465 Сочи – 1:440
5	Полнота сорбции антигена	От 80 до 100%	99 %
6	Стерильность	Вакцина должна быть стерильной	Стерильна
8	Аномальная токсичность	Вакцина должна быть нетоксичной	Нетоксична
11	Формальдегид	Не более 0,01 мг/доза	Отсутствует
12	Алюминий	От 1,0 до 1,5 мг/доза	1,11 мг/доза
16	pH	От 7,4 до 7,6	7,6
17	Упаковка	Вакцина по *1* дозе во флаконах объемом 5 мл из стекла 1-го гидролитического класса по ИСО 9187. Комплект состоит из 10 фл, содержащих 1 дозу (1 мл) вакцины.	Соответствует
18	Маркировка	В соответствии с ЛР 01895065-27-16	Соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:	Серия № **3** вакцины против ГЛПС культуральной очищенной концентрированной инактивированной соответствует требованиям ЛР 01895065-27-16

« 31 » октября 2016 г. Начальник ОКК: (Глыль Л.В.)

Глава 4 Результаты токсикологических исследований вакцины ГЛПС-Вак

4.1 Исследование острой токсичности

Гибели животных не было зарегистрировано ни в одной экспериментальной группе при внутримышечном пути введения половозрелым и неполовозрелым мышам, в связи с этим рассчитывать $ЛД_{50}$ не было необходимым. При осмотре всех групп животных было отмечено, что инфильтрат в месте введения отсутствует, все животные умеренно активны, шерстный покров ровный, гладкий. В целом, животные опытных групп выглядели и вели себя практически так же, как и животные контрольной группы. У животных контрольной группы и у всех подопытных животных величина зрачка и ширина глазной щели практически не менялись в течение всего периода наблюдения. Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось, за исключением незначительных травматических повреждений. Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены. Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. Кожа без признаков раздражения или воспаления.

Кожа в месте введения – без признаков раздражения или воспаления. Деформации или отека конечностей у неполовозрелых и у половозрелых животных не отмечалось. То есть введение препаратов не имело местно-раздражающего действия.

Наблюдения проводили также на открытой площадке. Двигательная активность была несколько снижена у всех животных, получавших исследуемые препараты в максимальной дозе и у части животных, получавших препараты в более низких дозах. Подобная картина была характерна как для половозрелых, так и для неполовозрелых животных. У части контрольных животных также отмечалось снижение активности. У животных, получавших максимальные объемы введения (в том числе и контрольных) наблюдалась хромота в течение первых 2-х часов после введений. Таким образом, выявленное отклонение было, в основном, обусловлено введением в мышцу критичного объема.

Ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус мышей изучали до начала введения препаратов и в конце периода наблюдения (на 14 день) для регистрации отсроченного влияния кратного (в течение 2-х часов) внутримышечного введения исследуемых препаратов. Изучение поведения не выявило какого-либо влияния внутримышечного введения препаратов на ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус мышей.

При тестировании в «открытом поле» животные до введения препаратов демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и

ориентировочно-исследовательской активностью без проявления признаков тревожности. Результаты изучения активность мышей в «открытом поле» на 14-й день после внутримышечного введения препаратов представлены в Таблице 11.

Таблица 11 - Локомоторная активность половозрелых мышей в «открытом поле» на 14-й день после введения препаратов (M ± m, n=5)

№ группы	Самцы			Самки		
	Количество пересеченных квадратов	Количество заглядываний в норки	Количество пристеночных стоек	Количество пересеченных квадратов	Количество заглядываний в норки	Количество пристеночных стоек
1	36,2±3,5	23,21±2,2	6,5±0,8	39,6±3,5	21,5±2,1	6,2±0,7
2	35,7±4,0	23,8±1,6	7,5±1,0	41,4±1,7	23,8±2,2	7,8±1,1
3	36,0±3,6	24,5±1,1	7,8±0,9	43,2±3,5	23,2±2,0	7,4±0,6
4	36,6±2,3	22,3±1,4	7,4±0,8	40,6±3,1	23,6±2,7	7,7±0,6

Внутримышечное и внутривенное введения половозрелым животным вакцины ГЛПС-Вак не повлияло на их поведение в «открытом поле». Статистическое сравнение значимых отличий не выявлено.

Результаты исследования эмоциональной реактивности животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в Таблицах 12 - 13.

Таблица 12 - Эмоциональный статус половозрелых самцов мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте» на 14-й день после введения ГЛПС-Вак (M±m, n=5)

Группа	Доза на животное	Кол-во посещений рукавов		Длительность нахождения в рукавах (сек)		
		Светлых	Темных	Светлых	Темных	Центр
Контрольная	0	2,1±0,4	3,1±0,2	31,8±8,5	133,1±8,8	15,1±2,8
ГЛПС-Вак	2,5 в/м	1,7±0,3	3,8±0,4	32,0±8,2	131,1±7,7	16,6±4,0
	0,5 в/в	1,4±0,2	4,2±0,5	36,7±7,6	125,5±10,5	17,8±4,5

Таблица 13 - Эмоциональный статус половозрелых самок мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте» на 14-й день после введения препаратов (M±m, n=5)

Группа	Доза на животное	Кол-во посещений рукавов		Длительность нахождения в рукавах (сек)		
		Светлых	Темных	Светлых	Темных	Центр
Контрольная	0	1,6±0,3	3,0±0,1	32,4±7,6	130,5±7,3	16,3±3,6
ГЛПС-Вак	2,5 в/м	1,8±0,1	3,6±0,4	30,6±6,4	132,1±6,4	17,1±1,0
	0,5 в/в	2,2±0,2	3,5±0,2	25,4±7,2	141,6±7,0	13,1±1,0

Влияния фактора «введение препаратов» на поведение животных обнаружено не обнаружено. После введения вакцины картина интоксикации была невыражена, наблюдалось незначительное угнетение общего состояния, гиподинамия у животных,

получавших максимальные дозы вакцины. Все проявления интоксикации исчезали в течение 2-3-х часов после момента введения препарата. Вакцина не оказывала местно-раздражающего действия. Гибели на протяжении 14-х суток от момента введения препаратов не наблюдалось.

Влияние введения вакцины на динамику массы тела половозрелых экспериментальных животных представлено в Таблицах 14 - 19.

Таблица 14 - Влияние острого 5-кратного в/м введения 2,5 мл физиологического раствора на массу тела половозрелых мышей

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	18,5	19,3	20,9	22,9	здорова	отсутствует
	2	19,2	20	21,5	24,6	здорова	отсутствует
	3	19,3	19,9	21,1	23,5	здорова	отсутствует
	4	19,6	20,1	21,5	24,3	здорова	отсутствует
	5	19	19,3	21,2	24,8	здорова	отсутствует
самки	6	18	18,5	19,9	23,8	здорова	отсутствует
	7	18	18,5	20,3	23,2	здорова	отсутствует
	8	18,5	19,2	21,8	25	здорова	отсутствует
	9	18,1	18,8	20,7	24,1	здорова	отсутствует
	10	18,8	19,6	21,9	23,9	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**19,1 ±0,18**	**19,7±0,17**	**21,2±0,11**	**24,0±0,35**	-	-
самки		**18,3±0,07**	**18,9±0,21**	**20,9±0,4**	**24,0±0,29**	-	-
Группа в целом		**18,7±0,13**	**19,3±0,19**	**21,1±0,26**	**24,0±0,32**	-	-

Таблица 15 - Влияние острого 5-кратного в/м введения вакцины на массу тела половозрелых мышей (суммарно на одно животное – 2,5 дозы вакцины).

Пол живот-	Номер живот-	Масса животных, г				Общее состояние	Наличие инфильтрата
		фон	2-й день	7-й день	14-й		
самцы	1	20	20,5	21,9	23,9	здорова	отсутствует
	2	18,5	19,3	20,9	23,2	здорова	отсутствует
	3	19,2	20	21,5	24,6	здорова	отсутствует
	4	19,3	20	22	24,8	здорова	отсутствует
	5	19	19,6	21	23,5	здорова	отсутствует
Пол живот-	Номер живот-	Масса животных, г				Общее состояние	Наличие инфильтрата
		фон	2-й день	7-й день	14-й		
самки	6	18,1	18,7	20,7	24,1	здорова	отсутствует
	7	18,8	19,3	20,9	23,8	здорова	отсутствует
	8	18,2	18,9	20,8	24	здорова	отсутствует
	9	18,4	19	21,2	24,5	здорова	отсутствует
	10	18	18,7	21,4	24,3	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**19,2 ±0,24**	**19,9±0,2**	**21,5±0,22**	**24,0 ±0,3**	-	-
самки		**18,3 ±0,14**	**18,9 ±0,11**	**21,0 ±0,13**	**24,1 ±0,12**	-	-
Группа в целом		**18,8±0,19**	**19,4±0,16**	**21,2 ±0,18**	**24,1 ±0,21**	-	-

Таблица 16 -Оценка влияния вакцины на массу тела половозрелых мышей при в/м введении (2,5 дозы)

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	18,75±0,19	19,4±0,15	21,23 ±0,18	24,07 ±0,21
Контроль	18,7±0,13	19,32 ±0,19	21,08 ±0,26	24,01 ±0,32
Достоверность различий	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Таблица 17 - Влияние острого 5-кратного в/м введения 5 мл физиологического раствора на массу тела половозрелых морских свинок

Пол живот-ного	Номер животн ого	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	495	501	537	556	здорова	отсутствует
	2	464	469	500	539	здорова	отсутствует
	3	467	473	509	550	здорова	отсутствует
	4	473	480	518	552	здорова	отсутствует
	5	459	468	494	554	здорова	отсутствует
самки	6	452	462	497	549	здорова	отсутствует
	7	450	458	482	530	здорова	отсутствует
	8	495	503	520	557	здорова	отсутствует
	9	463	478	511	559	здорова	отсутствует
	10	451	460	493	547	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**471,6±6,27**	**478,2±6,08**	**511,6±7,54**	**550,2±2,97**	**-**	**-**
самки		**462,2±8,53**	**472,2±8,47**	**500,6±6,71**	**548,4±5,13**	**-**	**-**
Группа в целом		**466,9±7,4**	**475,2±7,27**	**506,1±7,12**	**549,3±4,05**	**-**	**-**

Таблица 18 - Влияние острого 5-кратного в/м введения вакцины на массу тела половозрелых морских свинок (суммарно 5 доз вакцины на одно животное)

Пол живот-ного	Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	473	485	523	558	здорова	отсутствует
	2	459	469	501	539	здорова	отсутствует
	3	483	493	528	560	здорова	отсутствует
	4	478	484	519	550	здорова	отсутствует
	5	479	496	532	563	здорова	отсутствует
самки	6	467	479	516	549	здорова	отсутствует
	7	452	460	497	541	здорова	отсутствует
	8	451	467	500	545	здорова	отсутствует
	9	450	458	496	543	здорова	отсутствует
	10	455	466	507	548	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**474,4 ±4,16**	**485,4 ±4,69**	**520,6 ±5,37**	**554,0 ±4,32**	-	-
самки		**455,0 ±3,11**	**466,0 ±3,67**	**503,2 ±3,73**	**545,2 ±1,5**	-	-
Группа в		**464,7±3,64**	**475,7±4,18**	**511,9±4,55**	**549,6±2,9**	-	-

Таблица 19 - Оценка влияния вакцины ГЛПС-Вак на массу тела половозрелых морских свинок при в/м введении (5 доз)

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	464,7±3,64	475,7±4,18	511,9±4,55	549,6±2,9
Контроль	466,9±7,4	475,2±7,27	506,1±7,12	549,3±4,05
Достоверность различий	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Исходя из представленных данных, введение исследуемых препаратов не повлияло на динамику массы тела половозрелых и неполовозрелых мышей в течение 15-ти дневного наблюдения при внутримышечном способе введения.

При остром внутривенном введении половозрелым беспородным мышам и морским свинкам вакцины и физиологического раствора ни одно животное не погибло. При осмотре всех групп животных было отмечено, что все животные умеренно активны, шерстный покров ровный, гладкий. В течение 14 суток наблюдения потери в массе тела у животных не фиксировалось. Результаты измерения массы тела половозрелых животных при внутривенном (в/в) введении препарата представлены в Таблицах 20 - 25.

Таблица 20 - Влияние острого в/в введения 0,5 мл физиологического раствора на массу тела половозрелых мышей

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	19,5	20,4	22	24,2	здорова	отсутствует
	2	19,4	19,9	21,6	24,9	здорова	отсутствует
	3	19,6	20	21,5	24,5	здорова	отсутствует
	4	19,7	20,2	21,3	24,3	здорова	отсутствует
	5	20	20,6	21,9	23,8	здорова	отсутствует
самки	6	18,2	19	20,7	24,1	здорова	отсутствует
	7	18	18,5	20,9	23,9	здорова	отсутствует
	8	18,7	19,3	21,3	24	здорова	отсутствует
	9	18,1	18,7	20,9	23,8	здорова	отсутствует
	10	18,3	18,9	20,8	23,1	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**19,6±0,1**	**20,2±0,13**	**21,7±0,13**	**24,3±0,18**	-	-
самки		**18,3±0,12**	**18,9±0,14**	**20,9±0,1**	**23,8±0,17**	-	-
Группа в целом		**18,95±0,1**	**19,6±0,13**	**21,3±0,11**	**24,1±0,18**	-	-

Таблица 21 - Влияние острого в/в введения вакцины на массу тела половозрелых мышей

Пол живот-ного	Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	19,7	20,2	22	24,6	здорова	отсутствует
	2	18,7	19,3	20,9	24	здорова	отсутствует
	3	19,6	20,5	21,9	24,8	здорова	отсутствует
	4	20	20,5	22,4	24,9	здорова	отсутствует
	5	19,9	20,3	21,8	23,8	здорова	отсутствует
самки	6	18,5	19,4	21,9	24,3	здорова	отсутствует
	7	18,1	18,9	20,8	23,7	здорова	отсутствует
	8	18,5	19,1	21	23,1	здорова	отсутствует
	9	18	18,9	20,5	22,9	здорова	отсутствует
	10	18,6	19,2	21,5	24,1	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**19,6±0,23**	**20,2±0,22**	**21,8±0,24**	**24,4±0,22**	**-**	**-**
самки		**18,3±0,12**	**19,1±0,1**	**21,1±0,25**	**23,6±0,27**	**-**	**-**
Группа в целом		**18,96±0,17**	**19,6±0,16**	**21,5±0,25**	**24,0±0,24**	**-**	**-**

Таблица 22 - Оценка влияния вакцины на массу тела половозрелых мышей при в/в введении (0,5 дозы)

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	18,96±0,17	19,6±0,16	21,5±0,25	24,0±0,24
Контроль	18,95±0,11	19,6±0,13	21,3±0,11	24,1±0,18
Достоверность различий	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Таблица 23 - Влияние острого в/в введения 8 мл физиологического раствора на массу тела половозрелых морских свинок

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	463	475	502	540	Здорова	отсутствует
	2	474	482	513	558	Здорова	отсутствует
	3	469	471	511	547	Здорова	отсутствует
	4	479	493	523	554	Здорова	отсутствует
	5	485	500	525	569	Здорова	отсутствует
самки	6	458	464	495	549	Здорова	отсутствует
	7	456	470	499	536	Здорова	отсутствует
	8	455	470	497	545	Здорова	отсутствует
	9	453	463	498	539	Здорова	отсутствует
	10	450	465	493	543	Здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**474,0±3,82**	**484,2±5,43**	**514,8±4,2**	**553,6±4,92**	**-**	**-**
самки		**454,4±1,36**	**466,4±1,5**	**496,4±1,1**	**542,4±2,27**	**-**	**-**
Группа в целом		**464,2±2,59**	**475,3±3,47**	**505,6±2,64**	**548,0±3,59**	**-**	**-**

Таблица 24 - Влияние острого в/в введения вакцины на массу тела половозрелых морских свинок; 5 доз на одно животное

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	2-й день	7-й день	14-й день		
самцы	1	486	496	529	567	Здорова	отсутствует
	2	473	487	527	561	Здорова	отсутствует
	3	463	473	516	543	Здорова	отсутствует
	4	474	485	523	556	Здорова	отсутствует
	5	491	500	532	570	Здорова	отсутствует
самки	6	459	469	504	538	Здорова	отсутствует
	7	468	479	519	552	Здорова	отсутствует
	8	458	468	500	545	Здорова	отсутствует
	9	450	459	496	531	Здорова	отсутствует
	10	454	473	498	544	Здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**477,4±4,93**	**488,2±4,7**	**525,4±2,76**	**559,4±4,76**	**-**	**-**
самки		**457,8±3,0**	**469,6±3,28**	**503,4±4,11**	**542,0±3,27**	**-**	**-**
Группа в целом		**467,6±3,97**	**478,9±3,99**	**514,4±3,44**	**550,7±4,01**	**-**	**-**

Таблица 25- Оценка влияния острого в/в введения вакцины на массу тела половозрелых морских свинок

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	467,6±3,97	478,9±3,99	514,4±3,44	550,7±4,01
Контроль	464,2±2,59	475,3±3,47	505,6±2,64	548,0±2,27
Достоверность различий	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

При остром пятикратном внутримышечном введении неполовозрелым беспородным мышам и морским свинкам Вакцины ГЛПС, как и физиологического раствора ни одно животное не погибло. При осмотре всех групп животных было отмечено, что инфильтрат в месте введения отсутствует, все животные умеренно активны, шерстный покров ровный, гладкий. В течение 14 суток наблюдения потери в массе тела у животных не зафиксировано (Таблицы 26 - 28).

Таблица 26 - Влияние острого 5-кратного в/м введения 2,5 мл физиологического раствора на массу тела неполовозрелых морских свинок

Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
	фон	2-й день	7-й день	14-й день		
1	250	259	300	328	Здорова	отсутствует
2	265	271	295	323	Здорова	отсутствует
3	270	278	310	348	Здорова	отсутствует
4	250	260	305	330	Здорова	отсутствует
5	268	279	314	337	Здорова	отсутствует
6	274	286	311	334	Здорова	отсутствует
7	276	284	301	331	Здорова	отсутствует
8	263	277	308	330	Здорова	отсутствует
9	252	262	297	321	Здорова	отсутствует
10	267	276	301	339	Здорова	отсутствует
M ±m	**263,5±3,05**	**273,2±3,1**	**304,2±2,01**	**332,1±2,49**	-	-

Таблица 27 - Влияние острого 5-кратного в/м введения вакцины на массу тела неполовозрелых морских свинок (суммарно 2,5 дозы вакцины на одно животное)

Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
	фон	2-й день	7-й день	14-й день		
1	261	270	300	315	Здорова	отсутствует
2	250	259	287	325	Здорова	отсутствует
3	259	274	301	359	Здорова	отсутствует
4	254	270	306	326	Здорова	отсутствует
5	251	268	311	348	Здорова	отсутствует
6	274	282	314	329	Здорова	отсутствует
7	264	273	310	342	Здорова	отсутствует
8	278	289	318	335	Здорова	отсутствует
9	270	277	309	339	Здорова	отсутствует
10	268	280	316	332	Здорова	отсутствует
M ± m	**262,9±3,05**	**274,2±2,64**	**307,2±2,92**	**335±3,99**	-	-

Таблица 28 - Оценка влияния острого в/м введения вакцины на массу тела неполовозрелых морских свинок

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	262,9±3,04	274,2±2,64	307,2±2,92	335±3,99
Контроль	263,5±3,05	273,2±3,1	304,2±2,01	332,1±2,49
Достоверность различий	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Таким образом, острое введение вакцины ГЛПС-Вак как при внутримышечном введении, так и внутривенном введении в высоких дозах не выявило каких-либо отклонений или изменений во внешнем виде половозрелых и неполовозрелых животных, их поведении относительно контрольных групп животных (введение физиологического раствора). В течение 14 суток наблюдения все животные оставались здоровыми.

Некропсии подвергались все группы животных, участвующих в исследовании. Признаков раздражения кожи в месте введения у половозрелых и неполовозрелых мышей не отмечалось. Грудная и брюшная полости выпота не содержали. Положение внутренних органов грудной и брюшной полостей нарушений не представляло. Париетальный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы овальной формы, бледно-желтого или розоватого цвета, с гладкой поверхностью, тонкой капсулой, не спаяны между собой и подлежащими тканями. Поверхность разреза однородной окраски. Щитовидная железа плотно прилежала к гортани, имела обычные размеры и плотность, розовато-красноватый цвет. Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Интима аорты гладкая, блестящая, бледно-розового цвета. Диаметр аорты не изменен. Листки перикарда тонкие, прозрачные, гладкие. Величина и форма сердца изменений не представляют. Левый желудочек сокращен, в правом содержится незначительное количество темной жидкой крови. Клапаны сердца тонкие, блестящие, гладкие. Мышца сердца на разрезе однородной светло-коричневой окраски, умеренно плотная. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску; легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску. Слизистая оболочка трахеи и главных бронхов была гладкой, блестящей, бледно-розовой. Селезенка обычной формы, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа гладкая, капсула тонкая. На разрезе, на темно-красном фоне селезенки видны мелкие серого цвета фолликулы. Слизистая пищевода блестящая, гладкая, бледного цвета. Желудок обычной величины и формы, заполнен остатками пищевого содержимого. Слизистая тела желудка складчатая, бледно-розовая, блестящая. Слизистая оболочка тонкого кишечника бледно-розового цвета, блестящая, гладкая. Слизистая оболочка толстой кишки серого цвета, блестящая, гладкая. Поджелудочная железа плоской формы, бледно-розового цвета, дольчатая, умеренно плотной консистенции. Форма и величина печени изменений не представляют. Поверхность печени гладкая, однородной темно-красной окраски, капсула тонкая, прозрачная. Ткань печени на разрезе полнокровная, умеренно плотная.

Величина и форма почек не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-сероватой окраски. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещество. Надпочечники округлой формы, бледно-желтого цвета, с гладкой поверхностью, умеренно плотные. На

разрезе выделяется мозговое вещество более темной окраски. Мочевой пузырь пустой или заполнен прозрачной мочой. Слизистая оболочка пузыря гладкая, блестящая, бледно-розовой окраски. Тело матки самок обычной плотности, величины и формы. Яичники темно-красного цвета, с неровной поверхностью, умеренно плотные. Яички самцов беловатого цвета, обычных размеров и плотности. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными. Вещество головного мозга имело умеренную плотность. Расширения желудочков мозга не наблюдалось .

Обследование мест введения препаратов не выявило каких-либо признаков, указывающих на наличие местно-раздражающего действия.

Таким образом, при макроскопическом исследовании половозрелых мышей, получавших вакцину, и контрольных мышей отличий в состоянии внутренних органов не обнаружено.

Результаты измерения массовых коэффициентов (МК) органов половозрелых мышей и морских свинок в % при остром внутримышечном введении вакцины представлены в Таблицах 29 и 30.

Результаты измерения массовых коэффициентов (МК) органов половозрелых белых мышей и морских свинок в % при остром внутривенном введении вакцины ГЛПС-Вак представлены в Таблицах 31 и 32.

Таблица 29 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых белых мышей при остром в/м введении ГЛПС-Вак, %

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-ники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники
1	1,29	0,52	0,99	4,91	0,65	0,82	0,65	0,013	1,26	0,67	0,96	4,69	0,67	0,79	0,63	0,017
2	1,35	0,57	1,05	5,02	0,70	0,79	0,66	0,017	1,21	0,60	0,95	4,83	0,65	0,78	0,60	0,009
3	1,22	0,45	1,02	4,63	0,53	0,69	0,53	0,012	1,18	0,61	0,85	4,67	0,57	0,73	0,57	0,016
4	1,32	0,64	0,89	4,81	0,64	0,81	0,55	0,013	1,17	0,40	0,97	4,68	0,60	0,69	0,52	0,008
5	1,28	0,62	0,95	4,69	0,58	0,78	0,53	0,016	1,24	0,54	0,79	4,73	0,66	0,79	0,62	0,012
6	1,22	0,76	0,88	4,79	0,55	0,80	0,63	0,008	1,70	0,51	0,94	5,02	0,64	0,85	0,68	0,013
7	1,13	0,69	0,81	4,56	0,56	0,77	0,56	0,016	1,47	0,59	0,88	4,83	0,59	0,84	0,55	0,013
8	1,28	0,48	0,96	4,60	0,60	0,80	0,52	0,012	1,50	0,54	0,96	4,71	0,54	0,88	0,67	0,013
9	1,29	0,62	0,87	4,73	0,58	0,79	0,54	0,017	1,18	0,65	0,90	4,61	0,65	0,78	0,61	0,016
10	1,13	0,42	0,92	4,73	0,63	0,79	0,59	0,013	1,23	0,62	0,95	4,81	0,66	0,86	0,58	0,012
Сред-нее ±se	**1,25±0,02**	**0,58±0,03**	**0,93±0,02**	**4,75±0,04**	**0,6±0,01**	**0,78±0,01**	**0,58±0,01**	**0,014± 0,0009**	**1,31±0,05**	**0,57±0,02**	**0,91±0,02**	**4,76±0,04**	**0,62±0,01**	**0,8±0,02**	**0,6±0,01**	**0,013± 0,0009**
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Таблица 30 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых морских свинок при остром в/м введении ГЛПС-Вак, %.

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелудочная железа	селезенка	почки	надпочечники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелудочная железа	селезенка	почки	надпочечники
1	0,60	0,53	0,74	3,66	0,43	0,15	0,85	0,042	0,63	0,52	0,79	3,50	0,33	0,15	0,90	0,037
2	0,65	0,43	0,76	3,51	0,34	0,13	0,90	0,029	0,65	0,46	0,78	3,56	0,35	0,13	0,83	0,028
3	0,58	0,43	0,80	3,60	0,35	0,17	0,98	0,033	0,59	0,44	0,74	3,53	0,37	0,09	0,89	0,037
4	0,60	0,44	0,73	3,51	0,36	0,09	0,98	0,038	0,64	0,51	0,78	3,45	0,40	0,11	0,85	0,036
5	0,62	0,45	0,71	3,44	0,40	0,14	0,89	0,036	0,59	0,50	0,79	3,54	0,39	0,11	0,94	0,039
6	0,56	0,44	0,71	3,57	0,33	0,09	0,95	0,035	0,55	0,47	0,80	3,53	0,35	0,13	0,87	0,036
7	0,58	0,51	0,72	3,47	0,34	0,11	0,88	0,040	0,56	0,43	0,75	3,41	0,34	0,14	0,91	0,022
8	0,66	0,48	0,70	3,48	0,41	0,16	0,86	0,027	0,61	0,45	0,82	3,43	0,36	0,16	0,84	0,036
9	0,66	0,48	0,72	3,40	0,36	0,13	0,91	0,032	0,57	0,50	0,80	3,39	0,37	0,11	0,87	0,046
10	0,59	0,48	0,77	3,51	0,42	0,15	0,82	0,037	0,62	0,47	0,80	3,54	0,36	0,13	0,91	0,046
Сред-	0,61±	0,47±	0,73±	3,51±	0,38±	0,13±	0,9±0	0,035	0,6±0	0,47±	0,79±	3,49±	0,36±	0,13±	0,88±	0,036
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Таблица 31 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых белых мышей при остром в/в введении ГЛПС-Вак, %

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники
1	1,26	0,63	1,00	4,77	0,71	0,75	0,54	0,008	1,27	0,66	0,96	5,02	0,61	0,79	0,61	0,013
2	1,42	0,42	0,88	4,79	0,63	0,71	0,54	0,008	1,25	0,63	1,00	4,88	0,71	0,88	0,58	0,013
3	1,10	0,65	0,90	4,61	0,65	0,78	0,57	0,012	1,45	0,52	1,01	4,56	0,52	0,85	0,65	0,012
4	1,26	0,87	0,91	4,81	0,65	0,87	0,65	0,013	1,26	0,69	0,91	4,89	0,69	0,82	0,65	0,009
5	1,26	0,42	0,97	5,04	0,59	0,80	0,59	0,008	1,26	0,63	0,97	4,92	0,55	0,88	0,59	0,013
6	1,12	0,58	0,87	4,85	0,54	0,83	0,62	0,012	1,23	0,53	0,95	4,69	0,66	0,78	0,62	0,008
7	1,19	0,53	0,82	4,73	0,66	0,86	0,53	0,012	1,69	0,51	0,93	4,98	0,63	0,84	0,68	0,013
8	1,20	0,44	0,96	4,58	0,68	0,68	0,52	0,012	1,22	0,65	0,98	4,55	0,65	0,77	0,61	0,008
9	1,39	0,50	0,92	4,71	0,63	0,76	0,59	0,008	1,12	0,56	0,92	4,50	0,60	0,72	0,56	0,008
10	1,20	0,41	0,91	4,67	0,58	0,79	0,58	0,012	1,24	0,54	0,87	4,73	0,66	0,79	0,62	0,008
Сред-нее ±se	**1,24±0,03**	**0,55±0,04**	**0,91±0,01**	**4,76±0,04**	**0,63±0,01**	**0,78±0,01**	**0,57±0,01**	**0,011±0,0007**	**1,3±0,05**	**0,59±0,02**	**0,95±0,014**	**4,77±0,06**	**0,63±0,02**	**0,81±0,016**	**0,62±0,01**	**0,01±0,0024**
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Таблица 32 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых морских свинок при остром в/в введении ГЛПС-Вак, %

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники
1	0,67	0,44	0,76	3,52	0,41	0,13	0,91	0,037	0,62	0,48	0,72	3,56	0,35	0,13	0,95	0,055
2	0,57	0,47	0,72	3,44	0,41	0,09	0,90	0,054	0,70	0,45	0,79	3,58	0,36	0,09	1,05	0,023
3	0,62	0,47	0,73	3,60	0,39	0,11	0,99	0,037	0,61	0,48	0,72	3,57	0,35	0,13	0,96	0,055
4	0,61	0,47	0,70	3,52	0,34	0,14	0,94	0,036	0,68	0,50	0,77	3,42	0,32	0,11	0,94	0,036
5	0,59	0,51	0,77	3,52	0,42	0,11	0,92	0,018	0,63	0,46	0,67	3,57	0,37	0,09	1,06	0,037
6	0,67	0,49	0,71	3,52	0,35	0,13	0,91	0,036	0,65	0,49	0,79	3,37	0,37	0,11	0,92	0,046
7	0,59	0,51	0,71	3,56	0,37	0,13	0,93	0,037	0,58	0,45	0,71	3,48	0,33	0,07	0,89	0,034
8	0,63	0,42	0,69	3,41	0,40	0,14	0,88	0,018	0,53	0,46	0,73	3,46	0,34	0,12	0,93	0,053
9	0,61	0,46	0,74	3,58	0,39	0,11	0,98	0,037	0,61	0,49	0,75	3,33	0,32	0,11	0,91	0,035
10	0,63	0,48	0,74	3,50	0,35	0,17	0,96	0,037	0,61	0,46	0,68	3,53	0,35	0,13	1,03	0,028
Сред-нее ±se	**0,62±0,01**	**0,47±0,009**	**0,73±0,008**	**3,52±0,012**	**0,38±0,009**	**0,13±0,007**	**0,93±0,011**	**0,035±0,004**	**0,62±0,01**	**0,47±0,005**	**0,73±0,013**	**3,49±0,028**	**0,35±0,006**	**0,11±0,006**	**0,96±0,02**	**0,04±0,0036**
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Проведенные исследования острой токсичности вакцины ГЛПС-Вак на аутбредных мышах и морских свинках показали, что вакцина в условиях острого внутримышечного применения не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных. При исследовании острой токсичности вакцины на аутбредных мышах значения $ЛД_{50}$ установить не удалось, в связи с отсутствием гибели экспериментальных животных. Максимальная доза вакцины при внутримышечном введении составила 1,5 дозы на половозрелую мышь и 5 доз на морскую свинку и была ограничена предельно возможными объемами введения для данного вида животных. Клиническая картина интоксикации при применении исследуемой вакцины была выражена неярко, наблюдалось незначительное угнетение общего состояния, при внутримышечном введении – хромота, гиподинамия. Причем, все указанное, в основном, было характерно как для животных, получивших исследуемые вакцины, так и для тех, которые получили контрольное вещество. Все проявления интоксикации исчезали в течение 2-х часов после момента введения препаратов. Ежедневное наблюдение за общим состоянием животных, поведенческими реакциями в руках и на открытой площадке, а также изучение индивидуального поведения показали, что введение вакцины ГЛПС-Вак не оказало отсроченного влияния на общее состояние, ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус экспериментальных животных. Вскрытие животных спустя 14 дней после острого введения вакцины не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с перенесенной интоксикацией. По результатам патоморфологических исследований внутримышечное введение вакцины в максимальных дозах не вызывало развития дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов [2].

4.2 Исследование хронической токсичности

При внутримышечном введении в течение 21 дня половозрелым беспородным мышам и морским свинкам вакцины (контроль – физиологический раствор) ни одно животное не погибло. При осмотре всех групп животных было отмечено, что инфильтрат в месте введения отсутствует, все животные умеренно активны, шерстный покров ровный, гладкий. В течение 21 суток наблюдения потери в массе тела у животных не фиксировалось.

Результаты измерения массы тела половозрелых животных при пролонгированном внутримышечном (в/м) введении препарата представлены в Таблицах 33 - 38.

Таблица 33 - Влияние пролонгированного в/м введения физиологического раствора на массу тела половозрелых мышей

Пол живот-ного	Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самцы	1	19,9	21,8	24,3	28,2	здоров	отсутствует
	2	18,5	20,9	22,9	27,1	здоров	отсутствует
	3	19,2	21,5	24,6	28,8	здоров	отсутствует
	4	19,3	21,1	23,5	27,4	здоров	отсутствует
	5	19,6	21,5	24,3	28,2	здоров	отсутствует
	6	20	21,9	24,1	28,7	здоров	отсутствует
	7	19	21,2	24,8	29,3	здоров	отсутствует
	8	20	21,5	24,8	28,7	здоров	отсутствует
	9	20	21,9	24,3	28,6	здоров	отсутствует
	10	18,8	21,9	23,9	27,9	здоров	отсутствует
самки	11	18,3	20,5	22,9	27,1	здорова	отсутствует
	12	19,2	20,9	24	28,2	здорова	отсутствует
	13	18,1	20,7	24,1	28,6	здорова	отсутствует
	14	18	21	24,6	28,5	здорова	отсутствует
	15	18,5	21,8	25	29,5	здорова	отсутствует
	16	18	19,9	23,8	27,7	здорова	отсутствует
	17	18,5	20,9	23,9	28,2	здорова	отсутствует
	18	19,2	21,5	24,6	28,9	здорова	отсутствует
	19	18	21,1	24,3	28,9	здорова	отсутствует
	20	18	20,3	23,2	27,4	здорова	отсутствует
самцы	**M ±m**	**19,43±0,17**	**21,52±0,11**	**24,15±0,19**	**28,29±0,21**	**-**	
самки		**18,38±0,15**	**20,86±0,17**	**24,04±0,2**	**28,3±0,23**	**-**	
Группа в целом		**18,91±0,16**	**21,19±0,14**	**24,1±0,19**	**28,3±0,22**	**-**	

Таблица 34 - Влияние пролонгированного в/м введения ГЛПС-Вак на массу тела половозрелых мышей

Пол живот-ного	Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрат в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самцы	1	18,5	21,9	24,3	28,2	здоров	отсутствует
	2	19,6	21,9	24,8	29,1	здоров	отсутствует
	3	19,7	22	24,6	28,5	здоров	отсутствует
	4	20	22,4	24,9	29,4	здоров	отсутствует
	5	18,6	21,5	24,1	28,6	здоров	отсутствует
	6	19,9	21,8	23,8	27,7	здоров	отсутствует
	7	19,7	21,3	24,3	28,5	здоров	отсутствует
	8	19,4	21,6	24,9	29,1	здоров	отсутствует
	9	20	21,9	23,9	28,5	здоров	отсутствует
	10	19,5	22	24,2	28,8	здоров	отсутствует

Таблица 34 Продолжение

Пол живот-ного	Номер животного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрат в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самки	11	18,1	20,9	23,8	28,0	здорова	отсутствует
	12	18,5	20,9	23,2	27,8	здорова	отсутствует
	13	18	20,3	23,9	28,3	здорова	отсутствует
	14	18	20,9	22,9	27,3	здорова	отсутствует
	15	19,2	21,5	24,6	29,0	здорова	отсутствует
	16	18	20,5	22,9	27,2	здорова	отсутствует
	17	18,7	20,9	24	28,3	здорова	отсутствует
	18	18,2	20,7	24,1	28,6	здорова	отсутствует
	19	18,5	21	23,1	27,0	здорова	отсутствует
	20	18,1	20,8	23,7	27,6	здорова	отсутствует
самцы	**M ± m**	**19,49±0,17**	**21,83±0,09**	**24,38±0,14**	**28,64±0,15**	**-**	
самки		**18,33±0,12**	**20,84±0,98**	**23,62±0,18**	**27,91±0,2**	**-**	
Группа в целом		**18,91±0,15**	**21,34±0,09**	**24,0±0,16**	**28,28±0,18**	**-**	

Таблица 35 - Сравнение масс тела экспериментальных мышей после введения вакцины и физиологического раствора (контроль)

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	18,91±0,16	21,34±0,14	24,0±0,19	28,28±0,22
Контроль	18,91±0,15	21,19±0,09	24,1±0,16	28,3±0,18
	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Таблица 36 - Влияние пролонгированного в/м введения физиологического раствора на массу тела половозрелых морских свинок

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самцы	1	495	537	556	590	здоров	отсутствует
	2	479	532	563	602	здоров	отсутствует
	3	471	513	548	589	здоров	отсутствует
	4	469	517	560	600	здоров	отсутствует
	5	489	531	569	609	здоров	отсутствует
	6	466	510	548	586	здоров	отсутствует
	7	472	518	545	581	здоров	отсутствует
	8	483	528	560	606	здоров	отсутствует
	9	469	502	547	591	здоров	отсутствует
	10	460	497	522	568	здоров	отсутствует

Таблица 36 (продолжение)

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самки	11	459	506	550	596	здорова	отсутствует
	12	450	496	539	583	здорова	отсутствует
	13	451	493	547	586	здорова	отсутствует
	14	455	507	548	587	здорова	отсутствует
	15	450	496	543	588	здорова	отсутствует
	16	459	501	539	584	здорова	отсутствует
	17	452	497	541	584	здорова	отсутствует
	18	450	482	530	573	здорова	отсутствует
	19	451	515	550	595	здорова	отсутствует
	20	464	500	539	583	здорова	отсутствует
самцы	**M ± m**	**475,3±3,46**	**518,5±4,2**	**551,8±7,66**	**592,2±3,94**	**-**	
самки		**454,1±1,5**	**499,3±2,82**	**542,6±1,99**	**585,9±2,29**	**-**	
Группа в целом		**464,7±2,48**	**508,9±3,51**	**547,2±4,83**	**589,05±3,12**	**-**	

Таблица 37 - Влияние пролонгированного в/м введения вакцины на массу тела половозрелых морских свинок

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самцы	1	472	509	549	590	здоров	отсутствует
	2	468	510	558	599	здоров	отсутствует
	3	474	523	556	595	здоров	отсутствует
	4	465	508	547	592	здоров	отсутствует
	5	478	526	561	606	здоров	отсутствует
	6	459	497	542	587	здоров	отсутствует
	7	477	514	560	603	здоров	отсутствует
	8	486	529	567	614	здоров	отсутствует
	9	478	519	550	590	здоров	отсутствует
	10	483	523	564	603	здоров	отсутствует
самки	11	463	493	548	591	здорова	отсутствует
	12	459	504	538	585	здорова	отсутствует
	13	452	489	530	573	здорова	отсутствует
	14	450	493	543	590	здорова	отсутствует
	15	457	498	539	580	здорова	отсутствует
	16	451	500	545	587	здорова	отсутствует
	17	467	516	549	589	здорова	отсутствует
	18	467	509	550	588	здорова	отсутствует
	19	473	518	552	590	здорова	отсутствует
	20	452	497	549	587	здорова	отсутствует

Таблица 37 (продолжение)

Пол живот-ного	Номер живот-ного	Масса животных, г				Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введения
		фон	7-й день	14-й день	21-й день		
самцы	**M±m**	**474,0±2,6**	**515,8±3,14**	**555,4±2,56**	**597,9±2,71**	здоровы	отсутствует
самки		**459,1±2,55**	**501,7±3,13**	**544,3±2,17**	**586±1,76**	здоровы	отсутствует
Группа в целом		**466,55±2,58**	**508,75±3,13**	**549,85±2,36**	**591,95±2,24**	здоровы	отсутствует

Таблица 38 - Сравнение масс тела половозрелых морских свинок после введения вакцины и физиологического раствора (контроль)

	Масса животных, г			
	фон	2-й день	7-й день	14-й день
Вакцина	466,55±2,58	508,75±3,13	549,85±2,36	591,95±2,24
Контроль	464,7±2,48	508,9±3,51	547,2±4,83	589,05±3,12
Достоверность различий	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Результаты измерения массы тела половозрелых животных при пролонгированном внутримышечном (в/м) введении препарата представлены в Таблицах 39 - 41.

Таблица 39 - Влияние пролонгированного в/м введения физиологического раствора на массу тела неполовозрелых морских свинок

Номер живот-ного	Масса животных, г			Общее состояние животных	Наличие инфильтрата в месте введени
	фон	7-й день	14-й день		
1	250	300	338	здорова	отсутствует
2	255	287	323	здорова	отсутствует
3	261	301	348	здорова	отсутствует
4	258	306	330	здорова	отсутствует
5	257	311	337	здорова	отсутствует
6	250	314	334	здорова	отсутствует
7	263	310	339	здорова	отсутствует
8	250	318	325	здорова	отсутствует
9	265	309	359	здорова	отсутствует
10	270	316	350	здорова	отсутствует
11	250	289	324	здорова	отсутствует
12	268	308	329	здорова	отсутствует
13	274	304	342	здорова	отсутствует
14	276	302	335	здорова	отсутствует
15	263	298	339	здорова	отсутствует
16	252	290	334	здорова	отсутствует
17	267	300	331	здорова	отсутствует
18	278	318	347	здорова	отсутствует
19	270	309	330	здорова	отсутствует
20	268	307	338	здорова	отсутствует
M ±m	**262,25±2,05**	**304,85±2,04**	**336,6±2,07**	**---**	**---**

Таблица 40 - Влияние пролонгированного в/м введения ГЛПС-Вак на массу тела неполовозрелых морских свинок (250–300 г)

Номер живот-	Масса животных, г			Общее состояние	Наличие инфильтрата
	фон	7-й день	14-й день		
1	261	300	338	здорова	отсутствует
2	250	287	325	здорова	отсутствует
3	252	297	321	здорова	отсутствует
4	267	301	339	здорова	отсутствует
5	261	300	315	здорова	отсутствует
6	250	287	325	здорова	отсутствует
7	265	295	323	здорова	отсутствует
8	270	310	348	здорова	отсутствует
9	265	314	348	здорова	отсутствует
10	250	305	330	здорова	отсутствует
11	268	313	347	здорова	отсутствует
12	271	305	330	здорова	отсутствует
13	263	320	350	здорова	отсутствует
14	278	316	344	здорова	отсутствует
15	251	311	348	здорова	отсутствует
16	274	314	329	здорова	отсутствует
17	252	297	321	здорова	отсутствует
18	258	311	336	здорова	отсутствует
19	251	318	348	здорова	отсутствует
20	274	314	329	здорова	отсутствует
M ± m	**261,55±2,14**	**305,75±2,2**	**334,7±1,95**	---	---

Таблица 41 - Сравнение масс тела неполовозрелых экспериментальных морских свинок после введения вакцины и физиологического раствора (контроль)

	Масса животных, г		
	фон	7-й день	14-й день
Вакцина	**261,55±2,14**	**305,75±2,2**	**334,7±1,95**
Контроль	**262,25±2,05**	**304,85±2,04**	**336,6±2,07**
Достоверность различий	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Испытание хронической токсичности вакцины ГЛПС-Вак на половозрелых животных двух видов (морские свинки и белые лабораторные беспородные мыши) и неполовозрелых морских свинках при внутримышечном введении препарата были сравнимы с результатами, полученными в группах животных, которым вводили физиологический раствор (контроль). Не выявлено на протяжении всего периода испытания каких-либо отклонений или изменений в группах: гибели не наблюдалось, все животные были умеренно активны, устойчиво набирали вес, шерстный покров оставался ровным, гладким и блестящим, инфильтраты в местах введения препарата отсутствовали.

Непосредственно после многократного (21 дневного) введения препаратов двигательная активность животных была несколько снижена. У животных, получавших вакцину в высоких дозах, наблюдалось незначительное снижение двигательной

активности, у единичных животных - небольшую хромоту. Такие же проявления наблюдалось и у контрольных животных и, по всей видимости, были обусловлены самой процедурой введения и вводимыми объемами. Все указанные явления проходили в течение 2 - 3 часов после введения.

В целом, животные опытных групп на 7, 14 и 21 день после введения вакцины выглядели и вели себя практически так же, как и животные контрольной группы. Умеренная реакция на взятие в руки присутствовала не более чем у одного животного в группах, в том числе в контрольной, у остальных мышей реакция была стандартная низкая. Вокализация на взятие в руки присутствовала не более, чем у одного животного в группах.

У животных контрольной группы и у всех подопытных животных величина зрачка и ширина глазной щели практически не менялись в течение всего периода наблюдения. Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось, за исключением незначительных травматических повреждений. Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены. Дыхание было нормальным у всех экспериментальных животных. Слезотечения и нарушений слюноотделения не наблюдали. Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. У единичных животных наблюдались покусы. Деформации или отека конечностей у неполовозрелых и у половозрелых животных не отмечалось. То есть введение препаратов оказывало слабое местно-раздражающего действия, обусловленное длительным введением препаратов.

Наблюдения проводили также на открытой площадке. Двигательная активность была несколько снижена у всех животных, получавших исследуемые препараты в максимальной дозе и у части животных, получавших препараты в более низких дозах. Подобная картина была характерна как для половозрелых, так и для неполовозрелых животных. У части контрольных животных также отмечалось снижение активности. У животных, получивших максимальные объемы введения (в том числе и контрольных) наблюдалась хромота. Таким образом, выявленное отклонение было, в основном, обусловлено введением критичного объема.

Кровотечений у животных не наблюдали. Смертность животных в ходе изучения хронической токсичности не зафиксирована.

Ориентировочно-исследовательская активность и эмоциональный статус мышей изучались до начала введения препаратов на 14 и 21 день после завершения введения вакцины для регистрации отсроченного влияния введения исследуемых препаратов на поведение.

На 36-й день исследования все рефлексы были сохранены, нарушений координации не обнаружили, животные экспериментальных групп не отличались от

контрольных. Таким образом, через 14 дней после введения исследуемых препаратов никаких неврологических нарушений выявлено не было зафиксировано. К 42-му дню исследования (21–й день после завершения введения препаратов) никаких неврологических нарушений так же выявлено не было.

Результаты изучения поведения мышей в «открытом поле» представлены в Таблице 42.

Таблица 42 - Локомоторная активность половозрелых мышей в «открытом поле» на 42-й день внутримышечного введения препаратов (M ± m, n=10)

№ группы	Самцы			Самки		
	Количество пересеченных квадратов	Количество заглядываний в норки	Количество пристеночных стоек	Количество пересеченных квадратов	Количество заглядываний в норки	Количество пристеночных стоек
1	18,9±2,4	14,2±2,6	8,6±0,7	15,3±2,7	16,8±2,7	7,2±0,5
2	18,6±2,2	15,7±3,4	8,0±0,8	14,1±2,2	15,9±2,5	8,5±0,8

Данные подчинялись закону нормального распределения.

Результаты изучения эмоциональной реактивности животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в Таблицах 43 и 44.

Таблица 43 - Эмоциональный статус половозрелых самцов мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте» на 42-й день внутримышечного введения препаратов (M ± m)

№ группы	n	Кол-во посещений рукавов		Длительность нахождения в рукавах (сек)		
		Светлых	Темных	Светлых	Темных	Центр
1	4	3,2±0,6	7,1±0,4	44,7±6,1	120,5±9,5	10,5±3,6
2	4	3,3±0,6	4,6±0,9	47,3±11,0	121,5±11,3	12,3±1,5

Данные подчинялись закону нормального распределения

Таблица 44 - Эмоциональный статус половозрелых самок мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте» на 42-й день внутримышечного введения препаратов (M ± m)

№ группы	n	Кол-во посещений рукавов		Длительность нахождения в рукавах (сек)		
		Светлых	Темных	Светлых	Темных	Центр
1	4	3,2±0,2	4,3±0,5	37,1±7,6	120,8±10,2	19,2±3,1
2	4	2,7±0,2	5,1±0,9	35,8±2,1	133,3±6,1	11,0±4,2

Данные подчинялись закону нормального распределения

В таблице 45 представлены результаты влияния вакцины на гематологические показатели крови. Достоверных отличий по критерию 95% уровня вероятности между гематологическими показателями контрольных и экспериментальных животных, а также в сравнении с фоновыми показателями, не выявлено ($p > 0,05$). Все показатели находились в пределах физиологических норм.

Таблица 45 - Влияние ГЛПС-Вак на показатели периферической крови

Срок исследования	Контроль в/м		Вакцина ГЛПС-Вак в/м	
	m	f	m	f
	Гемоглобин, г/л			
Фон	131±12	129±12	132±14	121±14
30 день	131±13	128±12	131±14	122±11
	Гематокрит л/л			
Фон	0,45±0,11	0,46±0,08	0,46±0,07	0,46±0,11
30 день	0,46±0,07	0,47±0,08	0,45±0,08	0,47±0,06
	Эритроциты, 10^{12}/л			
Фон	5,8±0,05	5,2±0,05	5,8±0,11	5,3±0,09
30 день	6,0±0,05	5,5±0,11	6,0±0,08	5,6±0,17
	СОЭ мм/час			
Фон	2,9±0,3	3,1±0,4	3,0±0,24	3,5±0,22
30 день	3,1±0,3	3,8±0,3	3,1±0,3	4,6±0,5
	Тромбоциты,10^9/л			
Фон	388±71	411±73	412±66	426±71
30 день	445±61	458±53	473±52	482±53
	Ретикулоциты, ‰			
Фон	17,4±0,4	15,5±0,7	21,4±0,8	19,1±0,7
30 день	20,4±0,7	18,2±1,0	22,1±0,7	20,2±1,0
	Лейкоциты,10^9/л			
Фон	6,5±0,3	7,4±0,3	6,7±0,7	7,1±0,6
30 день	6,3±0,2	6,8±0,6	6,5±0,4	6,9±0,7
	П/я нейтрофилы, %			
Фон	0,2±0,03	0,2±0,03	0,2±0,05	0,2±0,05
30 день	0,2±0,26	0,3±0,11	0,3±0,07	0,3±0,25
	С/я нейтрофилы, %			
Фон	27,7±1,5	25,7±1,3	26,7±2,1	24,8±17
30 день	25,7±1,7	26,3±1,8	25,2±1,7	26,7±1,5
	Базофилы %			
Фон	0,63±0,02	0,7±0,15	0,67±0,08	0,69±0,14
30 день	0,66±0,15	0,61±0,17	0,67±0,25	0,59±0,28
	Моноциты %			
Фон	3,4±0,3	4,2±0,4	3,8±0,7	41±0,8
30 день	3,1±0,3	3,9±0,6	3,2±0,9	3,7±0,4
	Лимфоциты %			
Фон	64,4±5,2	74,7±5,0	65,8±7,2	73,8±7,0
30 день	65,3±61	75,6±6,2	64,6±6,8	76,5±5,3

В Таблице 46 представлены данные по влиянию вакцины на основные биохимические показатели крови половозрелых морских свинок при внутримышечном введении.

Оценка биохимических показателей периферической крови показала, что между контрольными животными, и морскими свинками, получавшими исследуемую вакцину ГЛПС-Вак внутримышечно, статистически значимые различия отсутствуют ($p>0,05$).

Таблица 46 - Влияние ГЛПС-Вак на биохимические показатели крови при внутримышечном введении

Срок исследования	Контроль в/м		Вакцина ГЛПС-Вак в/м	
	m	f	m	f
	Общий белок, г/л			
Фон	61,3±1,35	59,8±4,2	62,6±3,5	61±5,2
30 день	62,2±2,3	59,2±4,5	62,3±3,6	63±2,2
	АСТ, Е/л			
Фон	59,6±1,3	62,4±1,8	61,8±3,5	60,4±3,4
30 день	58,8±3,6	60,7±2,8	60,4±5,7	61,4±5,2
	АЛТ, Е/л			
Фон	54±3,2	53±3,1	57±2,2	55±2,9
30 день	53±2,5	52±4,7	55±4,1	56±5,3
	ЛДГ Е/л			
Фон	441,1±22	423,5±34	429,1±42	458,1±43
30 день	433,2±23	441,2±19	456,3±27	456,2±21
	Щелочная фосфатаза, Е/л			
Фон	121,4±2	119,1±5	127,4±3	121,1±5
30 день	117,1±8	116,1±3	130,1±8	129,1±9
	Мочевина, ммоль/л			
Фон	6,1±0,7	6,9±0,5	6,8±0,6	6,2±0,7
30 день	6,17±0,6	7,18±0,6	6,6±0,5	6,8±0,3
	Креатинин, ммоль/л			
Фон	4,6±0,3	4,86±0,1	4,7±0,7	4,6±0,7
30 день	4,99±0,6	5,8±0,7	4,9±0,7	4,8±0,4
	Глюкоза, ммоль/л			
Фон	6,2±0,6	7,6±0,7	7,1±0,6	6,5±0,7
30 день	7,3±0,3	7,5±0,8	7,9±0,4	7,6±0,6
	Общие липиды,г/л			
Фон	2,39±0,21	2,20±0,19	2,3±0,19	2,1±0,29
30 день	2,35±0,13	2,33±0,04	2,03±0,07	2,36±0,12
	Холестерин, ммоль/л			
Фон	1,39±0,37	1,14±0,21	1,73±0,23	1,77±0,44
30 день	1,19±0,14	1,19±0,32	1,45±0,31	1,6±0,22
	Билирубин общий, ммоль/л			
Фон	4,1±0,5	4,3±0,27	5,1±0,6	4,3±0,23
30 день	4,1±0,35	4,5±0,23	5,2±0,51	4,7±0,6
	Na, ммоль/л			
Фон	142±5	149±5	141±7	145±4
30 день	140±6	139±7	146±4	141±6
	К, ммоль/л			
Фон	4,4±0,5	4,9±0,2	5,1±0,5	5,4±0,33
30 день	4,7±0,1	5,1±0,3	5,1±0,3	5,3±0,7

Некропсии подвергались все группы животных, участвующих в исследовании. Остаточных признаков раздражения кожи в месте внутримышечного введения у мышей и морских свинок не отмечалось. Грудная и брюшная полости выпота не содержат. Положение внутренних органов грудной и брюшной полостей нарушений не

представляет. Париетальный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы овальной формы, бледно-желтого или розоватого цвета, с гладкой поверхностью, тонкой капсулой, не спаяны между собой и подлежащими тканями. Поверхность разреза однородной окраски. Щитовидная железа плотно прилежала к гортани, имела обычные размеры и плотность, розовато-красноватый цвет. Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Интима аорты гладкая, блестящая, бледно-розового цвета. Диаметр аорты не изменен. Листки перикарда тонкие, прозрачные, гладкие. Величина и форма сердца изменений не представляют. Левый желудочек сокращен, в правом содержится незначительное количество темной жидкой крови. Клапаны сердца тонкие, блестящие, гладкие. Мышца сердца на разрезе однородной светло-коричневой окраски, умеренно плотная. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску; легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску. Слизистая оболочка трахеи и главных бронхов была гладкой, блестящей, бледно-розовой. Селезенка обычной формы, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа гладкая, капсула тонкая. На разрезе, на темно-красном фоне селезенки видны мелкие серого цвета фолликулы. Слизистая пищевода блестящая, гладкая, бледного цвета. Желудок обычной величины и формы, заполнен остатками пищевого содержимого. Слизистая оболочка безжелезистой части желудка складчатая, бледно-розового цвета, блестящая. Слизистая тела желудка складчатая, бледно-розовая, блестящая. Слизистая оболочка тонкого кишечника бледно-розового цвета, блестящая, гладкая. Слизистая оболочка толстой кишки серого цвета, блестящая, гладкая. Поджелудочная железа плоской формы, бледно-розового цвета, дольчатая, умеренно плотной консистенции. Форма и величина печени изменений не представляют. Поверхность печени гладкая, однородной темно-красной окраски, капсула тонкая, прозрачная. Ткань печени на разрезе полнокровная, умеренно плотная. Величина и форма почек не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-сероватой окраски. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещество. Надпочечники округлой формы, бледно-желтого цвета, с гладкой поверхностью, умеренно плотные. На разрезе выделяется мозговое вещество более темной окраски. Мочевой пузырь пустой или заполнен прозрачной мочой. Слизистая оболочка пузыря гладкая, блестящая, бледно-розовой окраски. Тело матки самок обычной плотности, величины и формы. Рога матки тонкие, слизистая — блестящая, бледно-розовая. Яичники темно-красного цвета, с неровной поверхностью, умеренно плотные. Яички самцов беловатого цвета, обычных размеров и плотности. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными. Вещество головного мозга имело умеренную плотность. Расширения желудочков мозга не наблюдалось.

Таким образом, при макроскопическом исследовании состоянии внутренних органов половозрелых и неполовозрелых мышей и морских свинок, получавших вакцину ГЛПС-Вак, различий с контрольными животными не обнаружено.

Результаты измерения массовых коэффициентов (МК) органов половозрелых белых мышей и морских свинок в % представлены в Таблицах 47 и 48.

Таблица 47 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых белых мышей при пролонгированном в/м введении ГЛПС-Вак, %

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	Поджелудочная железа	селезенка	почки	надпочечники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелудочная железа	селезенка	почки	надпочечники
1	0,96	0,66	0,85	4,17	0,59	0,74	0,74	0,007	0,95	0,53	0,85	4,03	0,57	0,60	0,57	0,007
2	0,97	0,72	0,72	4,04	0,54	0,65	0,61	0,011	1,05	0,49	0,80	3,94	0,56	0,66	0,63	0,010
3	1,08	0,40	0,86	4,10	0,47	0,61	0,47	0,011	1,09	0,46	0,88	4,04	0,53	0,70	0,56	0,014
4	1,09	0,53	0,91	3,96	0,53	0,67	0,74	0,011	1,38	0,50	0,74	4,04	0,50	0,67	0,74	0,011
5	0,99	0,49	0,81	4,06	0,49	0,71	0,57	0,011	0,96	0,46	0,78	4,04	0,53	0,71	0,67	0,014
6	0,92	0,67	0,74	4,10	0,53	0,64	0,71	0,007	1,05	0,65	0,83	4,12	0,47	0,69	0,51	0,011
7	0,96	0,53	0,85	4,04	0,57	0,60	0,57	0,011	1,04	0,49	0,83	3,92	0,49	0,66	0,69	0,007
8	1,06	0,49	0,74	3,99	0,57	0,67	0,60	0,007	1,08	0,45	0,80	3,96	0,45	0,59	0,49	0,010
9	1,08	0,45	0,76	3,96	0,52	0,69	0,59	0,010	0,95	0,56	0,74	3,96	0,53	0,67	0,49	0,014
10	0,99	0,40	0,99	4,15	0,55	0,66	0,51	0,015	1,04	0,50	0,79	4,03	0,58	0,65	0,65	0,007
11	1,12	0,42	0,84	4,04	0,53	0,70	0,63	0,011	0,97	0,54	0,82	4,05	0,54	0,68	0,68	0,014
12	1,07	0,52	0,86	3,92	0,48	0,65	0,55	0,014	1,11	0,66	0,89	4,24	0,59	0,66	0,55	0,015
13	1,36	0,49	0,73	3,92	0,56	0,63	0,66	0,010	1,10	0,53	0,85	4,08	0,50	0,71	0,67	0,011
14	0,96	0,57	0,78	4,01	0,53	0,67	0,57	0,011	0,88	0,71	0,81	4,10	0,53	0,64	0,49	0,011
15	1,00	0,62	0,93	3,93	0,45	0,66	0,52	0,007	0,91	0,39	0,88	4,00	0,53	0,67	0,70	0,011
16	0,96	0,58	0,79	3,88	0,48	0,65	0,62	0,014	0,93	0,55	0,83	3,90	0,55	0,69	0,48	0,010
17	0,96	0,57	0,92	3,97	0,57	0,64	0,57	0,007	1,12	0,42	0,81	4,04	0,53	0,70	0,53	0,007
18	1,05	0,42	0,77	3,99	0,52	0,66	0,52	0,010	1,07	0,52	0,79	3,92	0,48	0,65	0,69	0,010
19	1,14	0,48	0,92	4,23	0,59	0,66	0,81	0,015	0,96	0,46	0,86	4,04	0,57	0,71	0,57	0,007
20	1,00	0,48	0,93	3,91	0,55	0,69	0,69	0,014	1,05	0,66	0,87	3,92	0,52	0,63	0,66	0,010
M± m	**1,04±0,02**	**0,53±0,03**	**0,84±0,016**	**4,02±0,04**	**0,53±0,01**	**0,66±0,01**	**0,61±0,01**	**0,011±0,0001**	**1,03±0,04**	**0,53±0,03**	**0,82±0,02**	**4,02±0.04**	**0,53±0,03**	**0,67±0,01**	**0,60±0,01**	**0,011±0,004**
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Таблица 48 - Массовые коэффициенты (МК) органов половозрелых морских свинок при пролонгированном в/м введении вакцины ГЛПС, %

Номер животного	Контрольная группа								Вакцина ГЛПС-Вак							
	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпочечники	головной мозг	сердце	легкие	печень	поджелу-дочная железа	селезенка	почки	надпоче-чники
1	0,66	0,42	0,91	3,16	0,32	0,08	0,83	0,035	0,64	0,49	0,70	3,14	0,37	0,10	0,85	0,024
2	0,85	0,48	0,88	3,32	0,35	0,10	0,93	0,028	0,71	0,43	0,70	3,22	0,32	0,12	0,83	0,033
3	0,75	0,44	0,83	3,31	0,34	0,08	0,88	0,029	0,72	0,46	0,89	3,32	0,34	0,12	0,83	0,051
4	0,72	0,39	0,90	3,27	0,36	0,12	0,85	0,027	0,68	0,44	0,71	3,23	0,39	0,09	0,85	0,039
5	0,76	0,42	0,83	3,22	0,37	0,14	0,83	0,031	0,70	0,38	0,92	3,15	0,33	0,10	0,87	0,034
6	0,67	0,41	0,84	3,36	0,31	0,09	0,89	0,036	0,59	0,41	0,84	3,34	0,38	0,09	0,90	0,034
7	0,67	0,48	0,77	3,28	0,32	0,10	0,96	0,026	0,81	0,44	0,76	3,24	0,37	0,12	0,84	0,027
8	0,63	0,46	0,88	3,29	0,39	0,08	0,85	0,027	0,81	0,43	0,66	3,15	0,38	0,08	0,90	0,038
9	0,77	0,43	0,87	3,33	0,34	0,10	0,92	0,031	0,79	0,39	0,71	3,19	0,34	0,10	0,91	0,034
10	0,61	0,39	0,72	3,34	0,37	0,09	0,82	0,027	0,70	0,41	0,80	3,28	0,36	0,10	0,85	0,017
11	0,78	0,41	0,83	3,23	0,37	0,10	0,83	0,034	0,69	0,53	0,74	3,43	0,33	0,14	0,88	0,051
12	0,66	0,44	0,68	3,25	0,39	0,08	0,85	0,027	0,70	0,45	0,69	3,29	0,39	0,08	0,89	0,034
13	0,72	0,43	0,70	3,30	0,36	0,10	0,91	0,038	0,64	0,41	0,83	3,17	0,36	0,13	0,92	0,025
14	0,65	0,45	0,84	3,34	0,33	0,14	0,89	0,034	0,81	0,49	0,82	3,40	0,32	0,09	0,88	0,018
15	0,65	0,47	0,70	3,32	0,35	0,12	0,89	0,033	0,77	0,45	0,84	3,35	0,33	0,09	0,93	0,027
16	0,77	0,43	0,84	3,21	0,38	0,13	0,84	0,033	0,75	0,41	0,68	3,34	0,34	0,10	0,82	0,024
17	0,64	0,39	0,72	3,25	0,32	0,08	0,89	0,035	0,71	0,43	0,90	3,15	0,32	0,10	0,81	0,033
18	0,73	0,41	0,68	3,26	0,34	0,08	0,91	0,037	0,71	0,49	0,78	3,25	0,39	0,08	0,88	0,027
19	0,68	0,47	0,88	3,29	0,39	0,10	0,85	0,032	0,70	0,42	0,86	3,37	0,35	0,09	0,87	0,035
20	0,61	0,41	0,71	3,29	0,32	0,12	0,84	0,030	0,73	0,44	0,81	3,30	0,36	0,12	0,91	0,051
M± m	**0,70±0,008**	**0,43±0,01**	**0,80±0,02**	**3,28±0,03**	**0,35±0,006**	**0,10±0,005**	**0,87±0,02**	**0,032±0.02**	**0,72±0,01**	**0,44±0,04**	**0,78±0,007**	**3,27±0,028**	**0,35±0,001**	**0,10±0,007**	**0,87±0,02**	**0,033±0,002**
Достоверность различий МК органов									**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**	**p>0,05**

Испытание хронической токсичности вакцины ГЛПС-Вак на половозрелых животных двух видов (морские свинки и белые лабораторные беспородные мыши) и неполовозрелых морских свинках при внутримышечном введении препарата были сравнимы с результатами, полученными в группах животных, которым вводили физиологический раствор (контроль). Не выявлено на протяжении всего периода испытания каких-либо отклонений или изменений в группах: гибели не наблюдалось, все животные были умеренно активны, устойчиво набирали вес, шерстный покров оставался ровным, гладким и блестящим, инфильтраты в местах введения препарата отсутствовали.

При сравнении массовых коэффициентов органов половозрелых мышей и морских свинок, получивших вакцину внутримышечно, статистически значимых различий с контролем не установлено. Все показатели в пределах физиологической нормы.

После эвтаназии биоптаты тканей внутренних органов животных фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 24 часов, после чего материал проходил стандартную обработку в изопропиловом спирте, ксилоле и парафине для изготовления гистологических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS при увеличении 200 и 400. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320.

При морфологическом исследовании выявлено, что 21 дневное применение тестируемого препарата - вакцины ГЛПС-Вак патологических изменений в органах через 21 день после введения препарата не зафиксировано. Половых различий в гистологической картине не выявлено.

Проведенные экспериментальные исследования хронической токсичности на аутбредных мышах и морских свинках вакцины ГЛПС-Вак показали, что вакцина в условиях многократного (21-го дневного) внутримышечного применения не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных. Динамика массы тела контрольных и экспериментальных животных была положительной на протяжении всего исследования. Наблюдалось незначительное отставание в росте половозрелых и неполовозрелых морских свинок, получавших препараты в максимальном количестве – 0,5 дозы, при отмене препаратов динамика массы тела восстанавливалась.

Признаки интоксикации были практически не выражены. Наблюдаемое небольшое снижение активности животных после 20-ти дневного применения исследуемой вакцины и препарата сравнения было незначительным и обратимым. Ежедневное наблюдение во время изучения хронической токсичности за общим состоянием животных, поведенческими реакциями в руках и на открытой площадке, а также изучение индивидуального поведения показали, что введение вакцины в 2-х дозах внутримышечно не повлияло на общее состояние,

ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус мышей.

Гематологические и биохимические показатели у половозрелых морских свинок при длительном внутримышечном и внутривенном введении вакцины оставались в пределах физиологической нормы.

При патоморфологическом исследовании внутренних органов половозрелых и неполовозрелых морских свинок и беспородных белых мышей, которым вводили вакцину и физиологический раствор (контроль) не вызывало раздражения, воспаления или деструкции тканей в месте введения; не выявлено макроскопических изменений головного мозга, внутренних и эндокринных органов, гиперволемического отека внутренних органов, что подтверждается величинами их массовых коэффициентов. Слабовыраженное местно-раздражающее действие при многократном внутримышечном введении наблюдалось у некоторых животных как из опытной, так и из контрольной групп, что может быть обусловлено длительной травматизацией в месте инъекции.

В результате гистологического исследования показано, что пролонгированное введение вакцины мышам и морским свинкам не сопровождалось развитием дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов [2].

4.3 Исследование аллергизирующих свойств

Результаты постановки теста «реакция общей анафилаксии» на морских свинках представлены в Таблицах 49 и 50.

У несенсибилизированных животных самцов и самок контрольных групп не отмечали признаков анафилактической реакции по индексу Weigle после введения разрешающих доз вакцины. Отклонений в поведении и состоянии животных не было обнаружено.

Таблица 49-Результаты оценки теста «реакция общей анафилаксии» в индексах Weigle на половозрелых самцах морских свинок

Группа №	Тестируемые вещества		Индекс Weigle				
			Животное №				
	Сенсибилизация, доза или мл/м.св.	Разрешение, доза или мл/м.св.	1	2	3	4	5
1	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
2	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
3	(Вакцина,1 доза)	Вакцина ГЛПС-Вак, 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
4	(Вакцина, 3 дозы)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0

Таблица 50 - Результаты оценки теста «реакция общей анафилаксии» в индексах Weigle на половозрелых самках морских свинок

Группа №	Тестируемые вещества		Индекс Weigle				
			Животное №				
	Сенсибилизация, доза или мл/м.св.	Разрешение, доза или мл/м.св.	1	2	3	4	5
1	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
2	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
3	(Вакцина,1 доза)	Вакцина ГЛПС-Вак, 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0
4	(Вакцина, 3 дозы)	Вакцина ГЛПС-Вак 3 дозы (3 мл)	0	0	0	0	0

У сенсибилизированных животных была отмечена одна реакция в группе самок, получавших 3 дозы вакцины. У животного наблюдали признаки слабого анафилактического шока: беспокойство, учащение дыхания, почесывание мордочки и непроизвольное мочеиспускание. В течение 30 минут признаки аллергической реакции исчезли.

Таким образом, выявленная слабая реакция у одного животного позволяет заключить о возможной способности вакцины к сенсибилизации организма и индивидуальной чувствительности.

Результаты теста «реакция общей анафилаксии» у неполовозрелых животных представлены в Таблицах 51 и 52.

Таблица 51 - Оценка теста «реакция общей анафилаксии» в индексах Weigle на неполовозрелых самцах морских свинок

Группа №	Тестируемые вещества		Индекс Weigle				
			Животное №				
	Сенсибилизация, доза или мл/м.св.	Разрешение, доза или мл/м.св.	1	2	3	4	5
1	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
2	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
3	(Вакцина,1 доза)	Вакцина ГЛПС-Вак, 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
4	(Вакцина, 2 дозы)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0

Таблица 52 - Результаты оценки теста «реакция общей анафилаксии» в индексах Weigle на неполовозрелых самках морских свинок

Группа №	Тестируемые вещества		Индекс Weigle				
			Животное №				
	Сенсибилизация, доза или мл/м.св.	Разрешение, доза или мл/м.св.	1	2	3	4	5
1	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
2	Контроль (физиологический раствор)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
3	(Вакцина,1 доза)	Вакцина ГЛПС-Вак, 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0
4	(Вакцина, 2 дозы)	Вакцина ГЛПС-Вак 2 дозы (2 мл)	0	0	0	0	0

У несенсибилизированных животных самцов и самок контрольных групп не отмечали признаков анафилактической реакции по индексу Weigle после введения разрешающих доз вакцины. Отклонений в поведении и состоянии животных обнаружено не было. У сенсибилизированных животных была отмечена одна реакция в группе самок, получавших вакцину. У животного наблюдали признаки слабого анафилактического шока: беспокойство, учащение дыхания, почесывание мордочки и непроизвольное мочеиспускание. В течение 30 минут признаки аллергической реакции исчезли.

Таким образом, выявленная слабая реакция у одного животного позволяет заключить о возможной способности вакцины ГЛПС-Вак к сенсибилизации организма при индивидуальной чувствительности.

Результаты теста «конъюнктивальная проба» у половозрелых животных после введения разрешающей дозы в конъюнктивальный мешок (оценка реакции через 15 минут, 24 и 48 часов) представлены в Таблицах 53 и 54 [2].

Таблица 53 - Результаты теста «конъюнктивальная проба» у самцов морских свинок, n=5

Группа №	Тестируемые вещества, 0,1 мл/м.св.	Баллы			
		0	1	2	3
		Количество животных			
		15 мин/24 часа/48 часов			
Половозрелые					
1	Контроль (физиологический раствор)	5/5/5	0/0/0	0/0/0	0/0/0
2	Вакцина ГЛПС-Вак	5/5/5	0/0/0	0/0/0	0/0/0

Таблица 54 - Результаты теста «конъюнктивальная проба» самок морских свинок, n=5

Группа №	Тестируемые вещества, 0,1 мл/м.св.	Баллы			
		0	1	2	3
		Количество животных			
		15 мин/24 часа/48 часов			
Половозрелые					
1	Контроль (физиологический раствор)	5/5/5	0/0/0	0/0/0	0/0/0
2	Вакцина ГЛПС-Вак	5/5/5	0/0/0	0/0/0	0/0/0

После закапывания в конъюнктивальный мешок животным контроля – физиологического раствора, признаков развития аллергической реакции на протяжении опыта не наблюдали. Через 15 минут, 24 часа и 48 часов после закапывания вакцинного препарата в исследуемых дозах также отсутствовали признаки аллергического конъюнктивита.

Таким образом, при постановке теста «реакция общей анафилаксии» у несенсибилизированных и сенсибилизированных животных после введения разрешающей дозы вакцины ГЛПС-Вак анафилактический шок не развивался. При введении разрешающей дозы вакцины у сенсибилизированных животных зарегистрировали только один случай развития слабой аллергической реакции. При постановке теста «конъюнктивальная проба» после нанесения вакцинного препарата на конъюнктиву морских свинок не происходило развития аллергического конъюнктивита.

4.4 Исследование иммунотоксичности

Влияние испытуемой вакцины ГЛПС-Вак на антителообразование определяли в реакции гемагглютинации на фоне иммунизации мышей эритроцитами барана (ЭБ) (Таблицы 55 - 58).

Таблица 55 - Титр гемагглютининов в сыворотках половозрелых мышей испытуемых и контрольных групп после применения вакцины (0,5 дозы)

№№ мышей	Контроль	ГЛПС-Вак
	титр антител ($\log_2$)	титр антител ($\log_2$)
1-М	7,42	8,02
2-М	8,02	7,95
3-М	7,23	8,40
4-М	8,06	8,01
5-М	7,17	7,26
6-F	7,23	7,71

(Таблица 55 продолжение)

№№ мышей	Контроль	ГЛПС-Вак
	титр антител (log 2)	титр антител (log 2)
7-F	7,11	8,55
8-F	7,93	8,50
9-F	8,01	8,66
10-F	7,99	7,29
Средний титр ± se	**7,52 ± 0,45**	**8,035 ± 0,5**

Таблица 56 - Оценка влияния вакцины на выработку агглютининов в крови половозрелых мышей (n=10)

Наименование материала	Доза/ мл	Средний титр антител ± se (log 2)	ИР = О:К
ГЛПС-Вак	0,5/0,5	8,035 ± 0,5	**1,07**
Контроль	0/0,5	7,52 ± 0,45	-

Таблица 57 - Титр гемагглютининов в сыворотках неполовозрелых мышей испытуемых и контрольных групп после применения вакцины

№№ мышей	Контроль	ГЛПС-Вак
	титр антител (log 2)	титр антител (log 2)
1-M	7,64	8,89
2-M	8,42	9,44
3-M	7,15	9,12
4-M	7,93	9,65
5-M	7,09	9,32
6-F	7,17	7,26
7-F	6,96	7,99
8-F	6,86	8,69
9-F	8,12	7,87
10-F	7,42	8,66
Средний титр ± se	**7,46 ± 0,54**	**8,86 ± 0,58**

Таблица 58 - Оценка влияния вакцины на выработку агглютининов в крови неполовозрелых мышей (n=10)

Наименование	Доза/ мл	Средний титр антител ± se (log 2)	ИР = О:К
ГЛПС-Вак	0,5/0,5	8,86 ± 0,58	**1,18**
Контроль	0/0,5	7,46 ± 0,54	-

Для выявления влияния вакцин на специфический гуморальный иммунный ответ использовали определение титра гемагглютининов в опытных и контрольных группах половозрелых мышей. На 7 сутки после иммунизации в сыворотках определяли титр антител к ЭБ [17].

Иммунотоксическое воздействие вакцины ГЛПС-Вак на Т-клеточный иммунитет in vivo оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана (ЭБ) у мышей.

Результаты измерения масс инъецированных конечностей мышей в контрольных и испытуемых группах и индексы воспаления представлены в Таблицах 59 и 60.

Таблица 59 - Массы лап испытуемых и контрольных половозрелых мышей и индексы воспаления после применения вакцины

№№ мышей	Контроль			ГЛПС-Вак		
	$M_{o,\ мг}$	$M_{k,\ мг}$	ИВ, %	$M_{o,\ мг}$	$M_{k,\ мг}$	ИВ, %
1	65,6	58,6	7,8	70,6	63,8	10,7
2	76,5	69,0	10,8	76,4	69,5	10,0
3	74,9	68,2	9,8	81,9	74,6	9,8
4	77,4	70,2	10,25	78,8	71,0	11,0
5	83,6	76,1	9,85	81,1	74,6	8,8
6	88,0	80,2	9,7	99	90,0	10,0
7	67,3	60,9	10,5	78,9	72,1	9,5
8	80,9	74,5	8,6	92,6	84,3	9,9
9	78,3	71,3	9,9	84,4	76,6	10,2
10	74,7	67,7	10,4	92,6	85,5	8,3
Среднее значение ИВ, % ± se			**9,76± 0,91**			**9,82± 0,8**
Коэффициент Стъюдента p=0,95						**t = 0,2**

Различия между группами статистически не значимы.

Сравнение индексов воспаления в тесте определения гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана показало, что испытуемая вакцина ГЛПС-Вак не обладает ни стимулирующим, ни ингибирующим воздействием на иммунную реакцию как половозрелых, так и неполовозрелых мышей.

Проведенное исследование было направлено на установление иммунотоксических свойств вакцины ГЛПС-Вак при введении половозрелым и неполовозрелым животным. Введение вакцины в дозе 0,5 и 1,0 не оказывало угнетающего влияния на антителогенез; титр гемагглютининов был незначительно выше в сыворотках крови половозрелых мышей испытуемой группы по сравнению с контрольной группой (разница 0,51, log2), а значение

индекса реакции составило 1,07 [2].

Таблица 60 - Массы лап испытуемых и контрольных неполовозрелых мышей и индексы воспаления после применения ГЛПС-Вак

№№ мышей	Контроль			ГЛПС-Вак		
	$M_{o,\ мг}$	$M_{k,\ мг}$	ИВ, %	$M_{o,\ мг}$	$M_{k,\ мг}$	ИВ, %
1	44,2	40,5	9,2	5,0	51,0	9,8
2	56,3	52,0	8,4	45,8	41,3	11,0
3	48,2	44,2	8,8	45,8	41,3	10,8
4	45,0	41,2	9,4	48,5	44,4	9,2
5	54,5	50,0	9,1	53,7	48,6	10,6
6	39,8	36,6	8,7	58,0	53,6	8,3
7	47,0	42,9	9,5	55,7	50,2	10,9
8	51,2	46,6	9,9	48,3	44,6	8,4
9	47,9	43,8	9,3	50,2	45,9	9,3
10	55,5	51,0	8,8	43,6	39,7	9,9
Среднее значение ИВ, % ± sd			**9,11± 0,44**			**9,82± 1,0**
Коэффициент Стъюдента p=0,95						**t = 1,7**

Различия между группами статистически не значимы.

В испытуемой группе неполовозрелых мышей также отмечается некоторая тенденция к увеличению общего титра антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных вакциной, однако значение индекса реакции (1,18) не превысило порог, указывающий на стимулирующий эффект.

Полученные результаты дают основание утверждать: испытуемая вакцина в дозе 0,5 и 1,0 не оказывает как угнетающего, так и стимулирующего влияния на антителогенез.

4.5 Исследование эмбриотоксического действия

Результаты исследования на первом этапе свидетельствуют о том, что гибели или других признаков токсикоза у крыс-самок не отмечалось ни в опытных, ни в контрольных группах. Достоверных различий в темпах прироста массы тела беременных самок опытных и контрольной групп также не отмечалось.

Результаты изучения эмбриотоксического действия вакцины представлены в Таблицах 61 и 62.

Таблица 61 - Исследование эмбриотоксического действия вакцины на белых крысах при внутримышечном введении с 1-го по 19-й дни беременности

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество беременных самок	15	15
Количество желтых тел, всего/%	154 / 10,1 ± 0,8	159 / 12,1 ± 0,8
Количество мест имплантации, всего/%	154/ 9,1 ± 0,5	155 / 10,5± 0,5
Количество живых плодов, всего/%	154 / 9,8 ± 0,4	148 / 8,5 ± 0,3
Количество резорбций, всего/%	6 / 0,62 ± 0,07	6 / 0,42 ± 0,06
Предимплантационная смертность, %	6,84 ± 0,42	5,72 ± 0,91
Постимплантационная смертность, %	5,27 ± 0,39	4,89 ± 0,91
Масса плодов, г	2,22 ± 0,21	4,72 ± 0,15
Краниокаудальный размер, мм	30,5 ± 0,36	34,4 ± 0,33
Состояние внутренних органов количество обследованных плодов, из них с аномалиями развития	 53 0	 52 0
Состояние костной системы, количество обследованных плодов из них с аномалиями развития	 95 0	 98 0
Число центров оссификации, метакарнальных костей* справа слева метатарзальных костей справа слева	 2,3 ± 0,01* 2,6 ± 0,03 2,1 ± 0,01 2,5 ± 0,03	 2,8 ± 0,03 2,4 ± 0,02 2,4 ± 0,03 2,8 ± 0,05
Количество плодов с числом центров оссификации грудины %	23,6 ± 3,77	30,2 ± 3,67

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности нет.

Таблица 62 - Испытание эмбриотоксического действия вакцины на белых крысах при подкожном введении вакцины с 1-го по 19-й дни беременности

Показатели	Группы животных	
	контроль	ГЛПС-Вак
Количество беременных самок	15	15
Количество желтых тел, всего/%	157 / 11,5* ± 0,45	153 / 10,6 ± 0,47
Количество мест имплантации, всего/%	162 / 10,9 ± 0,8	157 / 11,6 ± 0,56
Количество живых плодов, всего/%	158 / 9,8 ± 0,9	161 / 12,6 ± 0,7
Количество резорбций, всего/%	6 / 0,82± 0,04	6 / 0,79 ± 0,17
Предимплантационная смертность, %	5,86 ± 0,48	5,79 ± 0,65
Постимплантационная смертность, %	3,75± 0,33	4,33± 0,30
Масса плодов, г	2,47 ± 0,13	2,69 ± 0,05
Краниокаудальный размер, мм	33,5 ± 0,43	33,8 ± 0,37

Таблица 62 (Продолжение)

Показатели	Группы животных	
	контроль	ГЛПС-Вак
Число центров оссификации, метакарнальных костей справа слева метатарзальных костей справа слева	 *2,5 ± 0,01 2,4 ± 0,03 2,2 ± 0,02 3,0 ± 0,01	 2,7 ± 0,02 2,5 ± 0,01 2,4 ± 0,01 2,8 ± 0,02
Количество плодов с числом центров оссификации грудины %	30,2 ± 2,72	28,9 ± 1,75

* M ± m

Не выявлено достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности.

При введении 0,5 прививочной дозы вакцины внутримышечно и 0,5 прививочной дозы вакцины подкожно в тиечение беременности не вызвало достоверного увеличения, по сравнению с контролем, пред- и постимплантационной смертности испытуемых крыс. При внешнем осмотре плодов, изучении состояния внутренних органов и скелета не выявлено каких-либо аномалий и отставания в росте и развитии плодов всех исследуемых групп. Отмеченные во всех группах случаи кровоизлияний в брюшную полость имеют нормальные частоты.

Таким образом, исследования показали, что внутримышечное и подкожное введение самкам крыс 0,5 прививочной для человека дозы вакцины ГЛПС-Вак с 1 по 19 день беременности не оказывало эмбриотоксического воздействия: показатели эмбрионального развития в опытных группах не имеют статистически значимых отклонений от показателей в группе контроля.

Не было отмечено гибели самок ни в одной из опытных, ни в контрольных группах. Темпы прироста массы тела беременных крыс достоверно не отличались в изучаемых группах. Отклонений в протекании беременности, родов, заботе о потомстве в подопытных группах также не наблюдалось.

Среднее количество плодов на одну самку и соотношение крысят по полу достоверно не отличалось в подопытных и контрольной группах (Таблицы 73 и 74).

Таблица 63 - Результаты изучения физического развития потомства крыс, получавших внутримышечно вакцину с 1-го по 20-й дни беременности

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество пометов	15	15
Количество крысят, в том числе живых	145/8,6* ± 0,8 122/8,2 ± 0,4	129/8,7 ± 0,8 127/8,2 ± 0,4
Гибель крысят в период вскармливания абсолютное числов процентах	2 1,8 ± 0,6	2 2,5 ± 0,2

Таблица 63 (Продолжение)

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество самцов	57	58
Количество самок	68	63
Соотношение полов (самцы/самки)	0,93 ± 0,12	0,99 ± 0,15
День отлипания ушной раковины	2,4 ± 0,05	2,6 ± 0,05
День появления первичного волосяного покрова	5,3 ± 0,5	4,2 ± 0,6
День прорезывания резцов	9,3 ± 0,6	9,8 ± 0,6
День открытия глаз	15,6 ± 0,15	15,1 ± 0,35
День опускания семенников	28,2 ± 2,3	23,5 ± 2,5
День открытия влагалища	23,8 ± 2,2	23,8 ± 2,5
Масса тела крысят, г*		
на 4 день	8,7 ± 0,23	8,5 ± 0,25
на 7 день	11,7 ± 0,48	12,4 ± 0,32
на 14 день	24,8 ± 0,44	17,9 ± 0,38
на 21 день	22,3 ± 0,34	26,2 ± 0,31
Гибель самок в период вскармливания	0	0

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем не выявлено при 95% уровне вероятности.

Таблица 64 - Результаты изучения физического развития потомства крыс, получавших ГЛПС-Вак при подкожном введении с 1-го по 20-й дни беременности

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество пометов	15	15
Количество крысят, в том числе живых, всего/%	137/9,3 ± 0,4* 125/8,8 ± 0,4	129/9,5 ± 0,5 121/8,5 ± 0,7
Гибель крысят в период вскармливания абсолютное число в процентах	3 2,1 ± 0,3	3 3,2 ± 0,3
Количество самцов	60	56
Количество самок	67	63
Соотношение полов (самцы/самки)	0,92 ± 0,07	0,86 ± 0,07
День отлипания ушной раковины	1,8 ± 0,12	1,9 ± 0,11
День появления первичного волосяного покрова	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,26
День прорезывания резцов	9,2 ± 0,3	9,0 ± 0,3
День открытия глаз	14,9 ± 0,24	14,2 ± 0,21
День опускания семенников	26,9 ± 1,7	27,5 ± 2,33
День открытия влагалища	33,4 ± 2,8	31,7 ± 2,13
Масса тела крысят, г		
на 4 день	8,5 ± 0,39	8,6 ± 0,62
на 7 день	11,8 ± 0,41	12,1 ± 0,43
на 14 день	23,5 ± 0,37	22,3 ± 0,39
на 21 день	30,8 ± 0,27	33,8 ± 0,31
Гибель самок в период вскармливания	0	0

*M ± m

Не обнаружено достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности.

В развитии крысят не выявлено достоверных различий в опытной и контрольной группах по таким показателям, как сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, опускание семенников и открытия влагалища.

Также не отличались скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания среди потомства подопытных и контрольных групп (Таблица 65).

Таблица 65 - День окончания формирования рефлекса потомства крыс, получавших вакцину при внутримышечном введении с 1-го по 20-й дни беременности

Тест	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Переворачивание на плоскости	4.8 ± 0,1*	4.7 ± 0,3
Отрицательный геотаксис	6.3 ± 0,28	6.8 ± 0,67
Избегание обрыва	6.9 ± 0,38	7.2 ± 0,19

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности нет.

Эмоционально-двигательное поведение 30-дневного потомства в тесте «открытое поле». Такие характеристики, как длительность латентного периода, число пересеченных квадратов, количество подъемов на задние лапы и заглядываний в отверстия, число актов груминга, эмоциональный фон не различались в экспериментальных группах (Таблица 66).

Таблица 66 - Эмоционально-двигательное поведение потомства крыс, получавших вакцину при внутримышечном введении с 1-го по 20-й дни беременности

Показатель	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Неподвижность, с	1,3 ± 0,1*	1.7 ± 0,5
Число пересеченных квадратов	43,7 ± 3,1	43,6 ± 4,2
Подъем на задние лапы	11,9± 1,7	12.5 ± 1,8
Заглядывания в отверстия	2,4± 0,4	3.3± 0,5
Эмоциональный фон	4,1	4.5 ± 0,3

* M ± m

Не выявлено достоверных отличий в эмоционально-двигательном поведении между опытной и контрольной группами при 95% уровне вероятности

Не выявлено статистически значимых отклонений показателей физического развития в постэмбриональном периоде развития крыс в опытной и контрольной группах по таким показателям, как скорость развития сенсорно-двигательных функций и эмоционально-

двигательная активность.

Таким образом, исследование эмбриотоксического действия вакцины на репродуктивную систему половозрелых белых крыс, а также антенатального повреждающего действия в постнатальном периоде на развитие эмбрионов крыс показало отсутствие токсического действия на репродуктивные органы животных, на развитие эмбрионов и на потомство, родившееся от самок, получавших вакцину в течение 20 дней беременности, в независимости от путей введения исследуемого препарата. Внутримышечное введение самкам крыс вакцины в одной и трех прививочных дозах с 1 по 19 день беременности не оказывает эмбриотоксического действия: показатели эмбрионального развития в опытных группах не имеют статистически значимых отклонений от показателей в группе контроля; физическое развитие, скорость развития сенсорно-двигательных функций и эмоционально-двигательная активность потомства опытных и получавших вакцины крыс также не показывают наличия отклонений [2].

4.6 Исследование влияния на репродуктивную функцию животных

В период введения вакцин снижения темпов прироста массы тела, изменений в поведении, гибели животных не отмечалось ни в одной из изучаемых групп самцов или самок. Индекс беременности достоверно не отличался в изучаемых группах (Таблица 67).

При вскрытии самок не было выявлено повышения уровней пред- и постимплантационной смертности в подопытных группах по сравнению с соответствующими контрольными группами (Таблицы 68 и 69). У оставленных рожать самок, каких-либо особенностей в протекании родов и заботе о потомстве не отмечено. Уровни гибели новорожденных крысят, соотношение самцов и самок в помете не различались в изучаемых группах. Сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов были синхронны в пометах подопытной и контрольной групп. Открытие глаз у потомства самцов и самок, получавших вакцину, произошло практически в те же сроки, как и в контрольной группе. Опускание семенников и открытие влагалища по срокам также не отличались в изучаемых группах Таблицы 70 и 71) [2].

Таблица 67 - Влияние в/м введения вакцины на плодовитость крыс

Показатели	Введение самцам		Введение самкам	
	Контроль	ГЛПС-Вак	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество самок, посаженных с самцами	40	40	40	40
Количество оплодотворенных самок	39	37	38	39
Количество беременных самок	38	37	38	38
Индекс беременности, %	**95**	**92,5**	**95**	**95**

Таблица 68 - Влияние в/м введения вакцины на репродуктивную функцию самцов крыс

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество беременных самок	20	20
Количество желтых тел	224/12,5 ± 0,4	228/10,9 ± 0,2
Количество мест имплантации	231/10,8 ± 0,5	212/10,7 ± 0,4
Количество живых плодов	208/11,3 ± 0,8	207/10,2 ± 0,4
Предимплантационная смертность абсолютное число в процентах	16 10,58 ± 1,04	14 11,03 ± 1,11
Постимплантационное смертность абсолютное число в процентах	7 3,99 ± 1,27	6 4,03 ± 1,17

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем не выявлено при 95% уровне вероятности.

Таблица 69 - Влияние в/м введения вакцины на репродуктивную функцию самок крыс

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество беременных самок	20	20
Количество желтых тел	215/10,3 ± 0,6	234/12,7±0,6
Количество мест имплантации	211/10,9 ± 0,3	214/11,3 ±0,5
Количество живых плодов	194/9,7 ± 0,8	207/10,4 ± 0,2
Предимплантационная смертность абсолютное число в процентах	13 9,83 ± 1,05	12 10,59 ± 1,08
Постимплантационное смертность абсолютное число в процентах	8 4,16 ± 0,40	10 5,02 ± 0,52

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности нет.

Таблица 70 - Показатели физического развития потомства самцов, получавших вакцину в течение 60 дней до спаривания

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество пометов	20	20
Количество крысят, в том числе живых	163/8,3 ± 0,32 160/7,8 ± 0,7	156/8,3 ± 0,21 153/7,7 ± 0,2
Гибель крысят в период вскармливания абсолютное число в процентах	9 6,6 ± 1,0	7 5.2 ± 0,9
Количество самцов	71	72
Количество самок	89	81
Соотношение полов (самцы/самки)	0,85 ± 0,12	0,87 ± 0,15
День отлипания ушной раковины	4,7 ± 0,11	5.8 ± 0,12
День появления первичного волосяного покрова	4,5± 0,23	4.6 ± 0,15
День прорезывания резцов	11.1 ± 0,42	12.0 ± 0,13

Таблица 70 (Продолжение)

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
День открытия глаз	15.2 ± 0,22	15.7 ± 0,52
День опускания семенников	26,8 ± 2,3	27,2 ± 1,7
День открытия влагалища	33,2 ± 4,23	33.7 ± 3.21
Масса тела крысят (г) на 4 день на 7 день на 14 день на 21 день	 8,5 ± 1,3 12,3 ± 3,1 18,3 ± 2,7 26,4 ± 0,4	 8,1 ± 0,2 11,8 ± 2,3 17,8 ± 1,9 27,4 ± 5,3
Гибель самок в период вскармливания	0	0

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности нет.

Таблица 71 - Показатели физического развития потомства самок, получавших вакцину в течение 15 дней до спаривания

Показатели	Группы животных	
	Контроль	ГЛПС-Вак
Количество пометов	20	20
Количество крысят, в том числе живых	162/8,5* ± 1,7 154/8,6 ± 0,3	165/9,3 ± 2,8 147/8,2 ± 3,5
Гибель крысят в период вскармливания абсолютное число в процентах	5 4,1 ± 0,5	5 3.1 ± 0,5
Количество самцов	65	67
Количество самок	89	80
Соотношение полов (самцы/самки)	0,82 ± 0,11	0.81 ± 0,04
День отлипания ушной раковины	5,7 ± 0,36	6.1 ± 0,15
День появления первичного волосяного покрова	4,9 ± 0,4	4.9 ± 1,6
День прорезывания резцов	11,7 ± 2,5	12.7 ± 2,2
День открытия глаз	14,5 ± 2,2	16.7 ± 3,4
День опускания семенников	31,4 ± 4.2	29,7 ± 3,5
День открытия влагалища	32,2 ± 2,4	32,6± 3,2
Масса тела крысят (г) на 4 день на 7 день на 14 день на 21 день	 8,2 ± 1,2 12,0 ± 2,2 21,4 ± 1,9 30,2 ± 3,3	 8,0 ± 0,6 13,2 ± 3,2 19,3 ± 2,4 29,9 ± 4,2
Гибель самок в период вскармливания	0	0

* M ± m

Достоверных отличий между опытом и контролем при 95% уровне вероятности нет.

Анализ полученных данных показал, что длительное внутримышечное введение вакцины ГЛПС-Вак в 0,5 прививочной дозе для человека не оказывает воздействия на репродуктивную функцию самцов и самок крыс [2].

Для всех полученных результатов была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие нормальному закону распределения. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, – критерий Краскела-Уоллиса. Различия были определены при 0.05 уровне значимости.Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0.

4.7 Исследование мутагенных свойств в тесте Эймса

Результаты тестирования представлены в Таблице 72.

Таблица 72 - Количество ревертантных колоний при тестировании ГЛПС-Вак в варианте без активации микросомальной фракцией S9 (M±SD), n=144

Тестируемый препарат	Штаммы			
	TA98	TA100	TA1535	TA1537
ГЛПС-Вак 0,00001 доза	5,21±2,15	6,00±2,34	6,53±0,30	6,25±1,67
ГЛПС-Вак 0,0001 доза	6,33±1,89	4,57±1,15	6,25±2,16	5,62±1,27
ГЛПС-Вак 0,001 доза	5,40±1,88	5,00±1,28	7,27±2,03	5,25±2,18
ГЛПС-Вак 0,01 доза	6,00±1,63	6,97±2,18	6,43±2,35	6,22±1,41
ГЛПС-Вак 0,1 доза	6,27±1,39	5,85±1,00	6,20±1,74	6,65±1,23
ГЛПС-Вак 1 доза	5,68±1,09	5,35±1,53	6,68±0,69	5,44±1,19
Негативный контроль, 0 мкг/мл	5,43±2,00	5,52±1,78	6,43±1,53	5,67±0,58
Базовая линия негативного контроля	7,97	7,25	8,05	7,37
2-нитрофлуорен 2,0 мкг/мл	45,43±1,58	-	-	-
N-оксид-4-нитрохинолин, 0,1 мкг/мл	-	41,57±4,19	-	-
N4-аминоцитидин, 100 мкг/мл	-		47,56±3,87	-
9-аминоакридин, 15 мкг/мл	-		-	45,49±3,23

При тестировании вакцины стандартные мутагены – 2-нитрофлуорен в конечной концентрации 2,0 мкг/мл (для штамма TA98), N-оксид-4-нитрохинолин в конечной концентрации 0,1 мкг/мл (для штамма TA100), N4-аминоцитидин в конечной концентрации 100 мкг/мл (для штамма TA1535), 9-аминоакридин в конечной концентрации 15 мкг/мл (для штамма TA1537) эффективно индуцировали обратные мутации в системе без активации микросомальной фракции S9.

Количество колоний с обратными мутациями в секциях с позитивным контролем было выше минимально допустимого значения (≥ 25 колоний для каждого позитивного контроля).

Количество ревертантов в секциях с позитивным контролем 2-NF составило 44,33±1,53 (штамм TA98), в секциях с позитивным контролем 4-NQO – 42,67±4,16 (штамм TA100), в секциях с АС – 46,00±2,65 (штамм TA1535), в секциях с 9-AAc – 46,67±1,53 (штамм TA1537).

Количество ревертантных колоний в секциях с негативным контролем не превышало максимально допустимые значения (≤ 8 для штаммов TA98, TA1535, TA1537 и ≤ 12 для штамма TA100). Количество *His*$^+$-ревертантов в секциях с негативным контролем составило: 5,33±1,53 (штамм TA98), 5,67±2,08 (штамм TA100), 6,33±1,53 (штамм TA1535), 5,67±0,58 (штамм TA1537).

Базовая линия негативного контроля для штамма TA98 (–S9) равна 6,86. Максимальное количество *His*$^+$-ревертантов составило 6,33±2,08 в секции, содержащей 0,1 дозу, что превышает базовую линию в 0,92 раз (p=0,2695). Базовая линия негативного контроля для штамма TA100 (–S9) равна 7,75. Максимальное количество *His*$^+$-ревертантов составило 6,00±2,00 в разведении 0,00001 и 0,01 дозы, что превышает базовую линию в 0,77 раза (p=0,4256). Базовая линия негативного контроля для штамма TA1535 (–S9) равна 7,86. Максимальное количество *His*$^+$-ревертантов составило 7,00±1,73 в разведении 0,001 доза, что превышает базовую линию в 0,89 раза (p=0,3217). Базовая линия негативного контроля для штамма TA1537 (–S9) равна 6,24. Максимальное количество *His*$^+$-ревертантов составило 6,67±1,53 в разведении 0,1 доза, что превышает базовую линию в 1,07 раза (p=1743) [2].

Таким образом, на штаммах TA98, TA100, TA1535, TA1537 в системе без активации метаболической фракцией S9 не было выявлено мутагенных свойств тестируемой вакцины в диапазоне разведения 1 – 0,00001 дозы. Количество ревертантов в данных концентрациях не превышало уровня базовой линии для всех штаммов более чем в 2 раза.

Результаты тестирования представлены в Таблице 73.

Таблица 73 - Количество ревертантных колоний при тестировании ГЛПС-Вак в присутствии микросомальной фракции S9 (M±SD), n=144

Тестируемый объект	Штаммы			
	TA98	TA100	TA1535	TA1537
ГЛПС-Вак, 0,00001 доза	5,37±2,05	5,48±2,33	6,45±2,63	6,87±2,05
ГЛПС-Вак, 0,0001 доза	7,27±2,53	6,48±2,17	5,47±1,58	6,56±2,35
ГЛПС-Вак, 0,001 доза	5,00±1,72	5,67±1,00	5,00±2,25	5,98±2,21
ГЛПС-Вак, 0,01 доза	6,22±1,25	7,12±1,45	5,55±1,15	4,68±1,33
ГЛПС-Вак, 0,1 доза	6,00±2,45	5,88±1,99	7,00±2,00	6,35±1,23
ГЛПС-Вак, 1 доза	6,00±1,01	5,17±1,22	6,35±1,11	6,45±1,26
Негативный контроль, 0 мкг/мл	5,34±1,21	5,37±1,00	6,76±1,27	5,46±1,49
Базовая линия негативного контроля	7,95	6,38	7,42	6,00
2-аминоантрацен, 5,0 мкг/мл	48,23±2,00	42,43±5,26	44,73±2,54	44,57±3,72

При тестировании вакцины ГЛПС-Вак в присутствии микросомальной фракции S9 в качестве позитивного контроля был использован стандартный мутаген 2-аминоантрацен в

конечной концентрации 5,0 мкг/мл для всех штаммов (Таблица 6, рисунки 16 - 19). Количество мутантных колоний в секциях, содержащих позитивный контроль, было выше минимально допустимого значения (≥ 25 колоний позитивного контроля). Количество ревертантов в секциях с позитивным контролем 2-АА составило 47,33±1,15 (штамм ТА98), 40,33±6,66 (штамм ТА100), 45,33±1,53 (штамм ТА1535), 43,67±2,52 (штамм ТА1537). Количество колоний с обратными мутациями в секциях, содержащих негативный контроль, в присутствии микросомальной фракции S9 не превышало максимально допустимые значения (≤ 8 для штаммов ТА98, ТА1535, ТА1537 и ≤ 12 для штамма ТА100). Количество ревертантов в секциях с негативным контролем составило: 5,33±2,52 (штамм ТА98), 4,67±1,15 (штамм ТА100), 6,33±1,15 (штамм ТА1535), 5,33±0,58 (штамм ТА1537).

Таким образом, на штаммах ТА98, ТА100, ТА1535, ТА1537 в присутствии микросомальной фракцией S9 не была выявлена мутагенная активность тестируемой вакцины ГЛПС-Вак в диапазоне разведений 1 – 0,00001 дозы. Количество позитивных лунок в данных разведениях не превышало уровня базовой линии более чем в 2 раза.

Установление мутагенных свойств вакцины ГЛПС-Вак (культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная вакцина для профилактики ГЛПС, суспензия для внутримышечного введения, 1 мл/доза) было проведено в тесте Эймса в микропланшетном формате (Ames MPF™ 98/100/1535/1537, Xenometrix, Швейцария).

В качестве индикаторных микроорганизмов были использованы бактериальные штаммы *S. typhimurium* ТА98, ТА100, ТА1535, ТА1537, в геном которых внесены мутации по типу замены пар оснований и сдвига рамки считывания. В результате мутаций у бактериальных штаммов была потеряна способность к росту на безгистидиновой среде. Воздействие потенциальных мутагенов могло привести к индукции обратных мутаций и способности к росту на среде, не содержащей гистидин.

В качестве негативного контроля применяли стерильную воду для инъекций. Для тестируемых препаратов количество His^+-ревертантов в секциях с негативным контролем в варианте без метаболической активации S9 и в системе с метаболической активацией S9 не превышало максимально допустимые значения (≤ 8 для штаммов ТА98, ТА1535, ТА1537 и ≤ 12 для штамма ТА100). В качестве позитивного контроля были использованы стандартные мутагены в соответствии с рекомендациями OECD 471. В варианте без метаболической активации микросомальной фракцией S9 применяли 2-нитрофлуорен (2мкг/мл; штамм ТА98), N-оксид-4-нитрохинолин (0,1 мкг/мл; штамм ТА100), N4-аминоцитидин (100 мкг/мл; штамм ТА1535), 9-аминоакридин (15 мкг/мл; штамм ТА1537). В варианте с метаболической активацией микросомальной фракцией печени крыс был использован стандартный мутаген 2-аминоантрацен (5 мкг/мл) для всех штаммов. Количество мутантных колоний в секциях с

позитивным контролем превышало минимально допустимое значение (≥ 25 колоний позитивного контроля) в варианте без метаболической активации S9 и в варианте с метаболической активацией S9.

При тестировании вакцины ГЛПС-Вак в варианте без активации микросомальной фракции печени и в присутствии фракции S9 не было выявлено мутагенных свойств на штаммах TA98, TA100, TA1535, TA1537 в разведениях препарата 1 – 0,00001 дозы [2].

Таким образом, вакцина ГЛПС-Вак в тесте Эймса не проявила мутагенного свойства на тестерных штаммах *Salmonella typhimurium* и может быть рекомендована для клинического применения.

Глава 5 Результаты исследования иммуногенности и стабильности вакцины ГЛПС-Вак

Результаты выявления нейтрализующих антител к вирусам Пуумала (ПУУ), Хантаан (ХТН) и Сочи (СОЧИ) в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации вакциной ГЛПС-Вак на разных сроках её хранения представлены в Таблицах 74 - 83. Эксперименты по выявлению нейтрализующих антител выполнены совместно с научными сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок С.С. Курашовой и к.б.н. М.С. Егоровой.

Результаты выявления нейтрализующих антител на нулевом сроке хранения свидетельствуют о хорошей иммуногенности вакцины: у 100% мышей, иммунизированных вакциной в разведении 1:8, выявлялись НАт со средним титом к вирусам ПУУ, ХТН, СОЧИ 128±13,1; 192±36,1; 112±13,1 соответственно.

Таблица 74 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови половозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной с нулевым сроком хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
1/2	10/10*	10/10	10/10	584±38,6	540±68,6	488±46,4	9.2±0,4	9,1±0,4	8,9±0,6
1/8	10/10	10/10	10/10	128±13,1	192±36,1	112±13,1	7,0±0,16	7,59±0,2	6,8±0,2
1/32	9/10	8/10	9/10	26,6±4,2	22,8± 3,1	26,6±3,6	4,7±0,21	4,5±0,16	4,7±0,17

Таблица 75 Нейтрализующие антитела в сыворотках крови неполовозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной с нулевым сроком хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
1/2	10/10*	10/10	10/10	520±30,6	460±38,6	388±40,4	9,02±0,2	8,85±0,4	8,6±0,3
1/8	10/10	10/10	10/10	116±18,1	192±36,1	112±13,1	6,8±0,3	7,62±0,17	6,81±0,16
1/32	10/10	8/10	8/10	26,2±6,2	22,8± 3,1	26,6±3,6	4,7±0,16	4,52±0	4,73±0,2

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Через 6 месяцев хранения иммуногенность вакцины по титрам вирус нейтрализующих антител не претерпела изменений (Таблицы 76, 77)

Таблица 76 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови половозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 6 мес. её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
1/2	10/10*	10/10	10/10	576±56,8	546±45,8	512±52,25	9,12±0,32	9,12±0,13	8,92±0,16
1/8	10/10	10/10	10/10	118±13,1	240±26,7	128±13,1	7,32±0,16	6,82±0,2	6,92±0,16
1/32	6/10	8/10	9/10	16±3,4	20±3,4	26±5,4	4,52±0,21	4,57±0,16	4,76±0,17

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Таблица 77 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови неполовозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 6 мес. её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
1/2	10/10*	10/10	10/10	544±53,3	448±44,3	288±34,4	9,0±0,15	8,7±0,16	8,1±0,13
1/8	10/10	10/10	10/10	168±14,4	120±13,4	112±13,1	7,3±0,15	6,8±0,17	6,7±0,16
1/32	10/10	6/10	8/10	32±6,1	12±4,04	22±3,33	4,9±0,16	4,3±0	4,7±0,18

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Результаты выявления нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей BALB/c спустя 1 год хранения вакцины ГЛПС-Вак в регламентированных условиях свидетельствуют о сохранности степени ее иммуногенности по сравнению с результатам контроля на 0 сроке хранения, титр нейтрализующих антител колебался в пределах одного разведения (Таблицы 78, 79).

Таблица 78 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови половозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 1 год её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
н/р	10/10*	10/10	10/10	544±48,8	512±52,3	480±53,3	9,02±0,15	8,92±0.16	8,82±0,16
1/2	10/10	10/10	10/10	304±44,3	240±26,7	224±26,1	8,12±0,2	7,82±0,17	7,72±0,16
1/8	10/10	10/10	10/10	128±13,1	112±13	104±12,2	6,92±0,16	6,72±0,16	6,62±0,15
1/32	6/10	5/10	6/10	24±4,4	23±4	23±3,33	4,65±0,21	4,52±0,2	4,48±0,17

Таблица79 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови неполовозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 1 год её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
н/р	10/10*	10/10	10/10	384±59,4	240±26,7	224±26,13	8,42±0,23	7,82±0,17	7,72±0,16
1/2	10/10	10/10	10/10	272±24,4	208±24,4	152±8	8,02±0,15	7,62±0,15	7,22±0,1
1/8	10/10	10/10	10/10	136±12,5	129±24,4	108±25,3	7,02±0,15	6,82±0,22	6,52±0,25
1/32	6/10	6/10	6/10	30±8,6	23±10,5	23±3,34	4,89±0,3	4,65±0,33	4,48±0,17

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Результаты выявления нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c иммунизированных через 2 года хранения вакцины ГЛПС-Вак в регламентированных условиях по сравнению с результатам контроля на 0 сроке хранения, показали, что вакцина сохраняет иммуногенность, соответствующую Спецификации (титр Ат ≥20) до разедения 1/2 у 100% иммунизированных мышей (Таблицы 80 - 81).

Таблица 80 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови половозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 2 года её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
н/р	10/10*	10/10	10/10	140±14,4	80±15,39	68±12,65	7,13±0,22	6,22±0,27	6,09±0,24
1/2	10/10	10/10	10/10	60±14	40±14,4	30±6,47	5,9±0,33	5,32±0,35	4,9±0,24
1/8	9/10	5/10	5/10	44±8,94	28±5,47	28±5,47	5,46±0,25	4,8±0,26	4,8±0,26
1/32	0/10	0/10	0/10	<20	<20	<20	<4,3	<4,3	<4,3

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Таблица 81- Нейтрализующие антитела в сыворотках крови неполовозрелых мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 2 года её хранения

Разведения вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log^2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
н/р	10/10*	10/10	10/10	92±16,69	52±6,44	56±6,88	6,52±0,12	5,7±0,23	5,81±0,14
1/2	10/10	10/10	9/10	42±9,13	24,4±3,1	27,5±3,9	5,39±0,2	4,58±0,22	4,78±0,24
1/8	10/10	6/10	3/10	30±3,51	22,8±3,08	26,6±8,1	4,91±13	4,51±0,31	4,73±0,17
1/32	0/10	0/10	0/10	<20	<20	<20	<4,3	<4,3	<4,3

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных животных

Через 2 года и 8 месяцев хранения иммуногенность вакцины была проверена на половозрелых мышах BALB/c, результаты которых приводятся в Таблице 82.

Нейтрализующие антитела выявлялись у 100% мышей к вирусу ПУУ, к вирусу ХТН у 7 из 10, и к вирусу СОЧИ у 6 из 10 иммунизированых мышей.

Таблица 82 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови мышей BALB/c после иммунизации вакциной через 2 года 8 мес. её хранения

Разведе-ния вакцины	Наличие нейтрализующих Ат			Средние титры нейтрализующих Ат			Средне титры нейтрализующих Ат в log2		
	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
н/р	10/10*	7/10	6/10	34±4,1	26±6,27	22±3,3	4,9±0,2	4,7±0,17	4,17±0,12
1/2	6/10	4/10	3/10	29,6±3,4	22±3,1	21,7±2,7	4,7±0,07	4,17±0,02	4,15±0,01
1/8	4/10	2/10	1/10	24±3,2	20,6±2,3	20±2,1	4,3±0,13	4,1±0,05	4±0,01

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных

В Таблице 83 представлены данные выявления нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи после иммунизации поливалентной вакциной в разведениях 1/2 и 1/8 после ее хранения в течение 6 месяцев, 1 года, 2-х лет и 2-х лет 8 месяцев в регламентируемых условиях.

Таблица 83 - Нейтрализующие антитела в сыворотках крови половозрелых мышей BALB/c, иммунизированных вакциной на разных сроках ее хранения

Срок	Нейтрализующие антитела			Титр нейтрализующих антител		
хранения вакцины	ПУУ	ХТН	СОЧИ	ПУУ	ХТН	СОЧИ
Разведение вакцины 1/2						
0	10/10*	10/10	10/10	584±38,6	540±68,6	488±46,4
6 мес	10/10	10/10	10/10	576±56,8	546±45,8	512±52,25
12 мес	10/10	10/10	10/10	304±44,3	240±26,7	224±26,1
2 года	10/10	10/10	10/10	60±14	40±14,4	30±6,47
2 года 8 мес	6/10	4/10	3/10	29,6±3,4	22±3,1	21,7±2,7
Разведение вакцины 1/8						
0	10/10	10/10	10/10	128±13,1	192±36,1	112±13,1
6 мес	10/10	10/10	10/10	118±13,1	240±26,7	128±13,1
12 мес	10/10	10/10	10/10	128±13,1	112±13	104±12,2
2 года	7/10	5/10	5/10	44±8,94	28±5,47	28±5,47
2 года 8 мес	4/10	2/10	1/10	24±3,2	20,6±2,3	20±2,1

* соотношение числа мышей с нейтрализующими антителами в титре ≥ 20 к общему числу иммунизированных

**средний титр антител ± стандартная ошибка

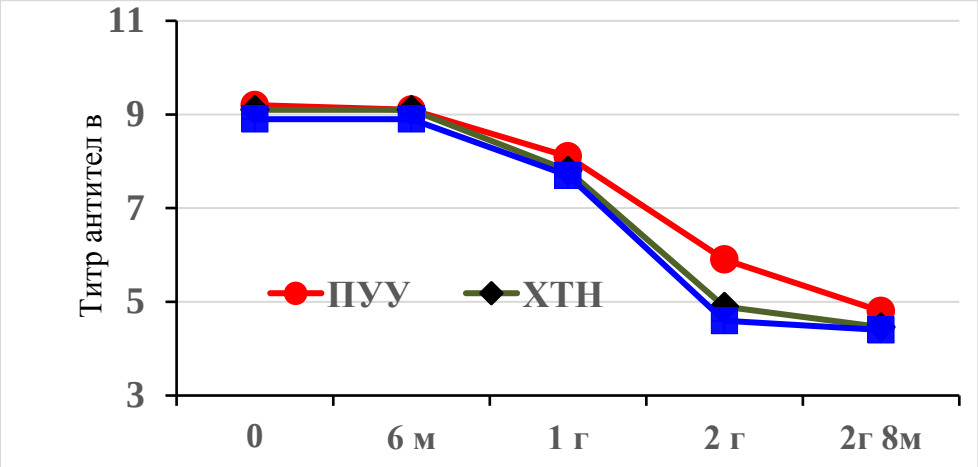


Рисунок 3 - Динамика нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи в сыворотках мышей BALB/c, иммунизированных вакциной в разведении 1/2 на разных сроках ее хранения.

По результатам выявления нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи можно сделать заключение, что в регламентируемых условиях хранения вакцина ГЛПС-Вак через 6 месяцев сохраняла исходный уровень иммуногенности, незначительно снизившийся через 1 год. Через 2 года хранения отмечено снижение титров нейтрализующих антител, тем не менее, вакцина до разведения 1/8 включительно индуцирует выработку нейтрализующих антител в титре более, чем 1/20 [2]. Согласно проекту Спецификации, титр нейтрализующих антител должен быть больше или равен 20 (≥ 4,32 $\log_2$) т.е. вакцина должна обеспечивать выработку нейтрализующих антител разведении не менее 1/20.

В неразведенном виде вакцина индуцирует выработку антител к вирусам Пуумала, Хантаан и Сочи в разведении ≥20 у 10/10, 7/10 и 6/10 мышей соответственно до конца срока испытания – 2 года и 8 месяцев (Таблица 19, Рисунки 3,4).

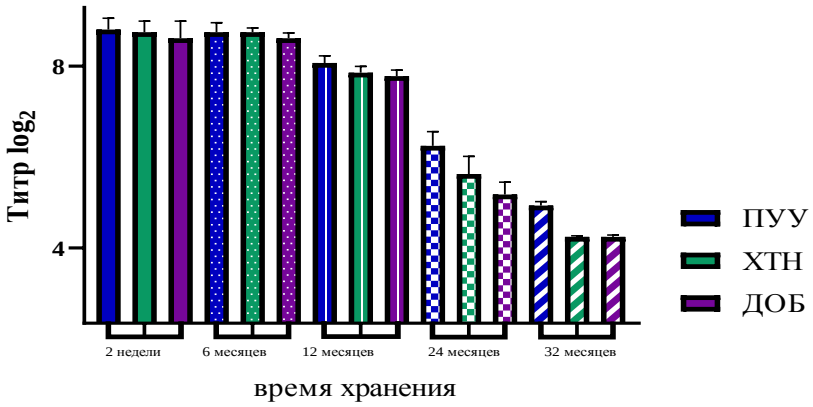


Рисунок 4 - Динамика нейтрализующих антител к вирусам Пуумала, Хантаан, Сочи в сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных вакциной ГЛПС-Вак.

Неспецифические показатели контроля вакцинных препаратов включают физико-химические характеристики вакцины, контроль аномальной токсичности, пирогенности, стерильности. Контроль по неспецифическим показателям вакцинного препарата при исследовании через 1 год, 2 года и 2 года 8 мес. Продемонстрировали их соответствие проекту Спецификации на вакцину. Данные физико-химического контроля через 2 года 8 месяцев хранения представлены в Таблице 84.

Таблица 84 - Результаты контроля вакцины ГЛПС-Вак по неспецифическим показателям через 2 года 8 месяцев хранения в регламентируемых условиях

Контролируемый параметр	**Требования ГФ и проекта НТД**	**Серия 1**	**Серия 2**	**Серия 3**
Описание	Непрозрачная суспензия	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Извлекаемый объем, мл	Не менее номинального (1,0)	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Размер частиц	Вакцина должна свободно проходить в шприц через иглу №0840	Вакцина проходит свободно в шприц через иглу №0840	Вакцина проходит свободно в шприц через иглу №0840	Вакцина проходит свободно в шприц через иглу №0840
pH	от 7,0 до 7,6	7,6	7,6	7,6
Бактериальные эндотоксины	Не более 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ	Менее 25 ЕЭ
Пирогенность	Должна быть апирогенна	Апирогенна	Апирогенна	Апирогенна
Аномальная токсичность	Должна быть не токсична	Не токсична	Не токсична	Не токсична
Стерильность	Должна быть стерильна	Стерильна	Стерильна	Стерильна
Время седиментационной устойчивости	При встряхивании не должна расслаиваться в течение 5 мин	Не расслаивается в течение 5 мин после встряхивания	Не расслаивается в течение 5 мин после встряхивания	Не расслаивается в течение 5 мин после встряхивания

Таким образом, по физико-химическим параметрам, стерильности, отсутствию пирогенности и аномальной токсичности вакцина ГЛПС-Вак после 2 лет 8 мес. хранения полностью соответствует требованиям регламентирующих документов на вакцинные препараты, вводимые людям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью диссертационной работы явились два последовательных направления:

– оптимизация технологических режимов на всех стадиях изготовления поливалентной (3 хантавируса) вакцины для профилактики ГЛПС, на основе данных,, полученных за последние 20 лет в результате исследований по разработке биотехнологических основ создания хантавирусных вакцинных препаратов [3, 12, 13, 67];

– доклинические исследования для доказательства безопасности и специфической эффективности поливалентной вакцины ГЛПС-Вак.

В результате проведенных исследований оптимизированы технологические этапы изготовления инактивированной вакцины против ГЛПС на основе трех вирусов, адаптированной к эпидемиологическим условиям РФ, то есть, с использованием наиболее эпидемиологически значимых хантавирусных штаммов. Приготовлены 3 серии экспериментальной вакцины для проведения доклинических исследований. Все методические подходы, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы для освоения промышленного производства вакцины ГЛПС-Вак.

Токсикологические исследования включали в себя изучение острой и хронической токсичностей, аллергизирующих свойств вакцины, влияния вакцины на иммунную систему, репродуктивной токсичности и эмбриотоксичности вакцины.

Показано, что вакцина ГЛПС-Вак не токсична, не обладает аллергизирующим, иммунотоксическим действием, не проявляет эмбриотоксического действия, а также негативного влияния на репродуктивную функцию организма лабораторных животных.

Вакцина ГЛПС-Вак является безопасной, высоко иммуногенной и стабильной при хранении в регламентируемых условиях (6±2 °С).

Широкое распространение, высокие показатели заболеваемости людей, значительная частота тяжелых форм течения болезни, сопровождающихся длительным периодом пониженной трудоспособности, отсутствие специфических средств лечения и профилактики обусловливают высокую актуальность и социальную и медицинскую значимость проблемы ГЛПС как в России, так и во многих странах мира [3].

Социально–экономическое значение ГЛПС для общества огромно и связано с её широкой распространенностью и высокой затратностью на лечение и реабилитацию.

Весьма важной является оценка социально–экономических затрат, в том числе прямых и непрямых, связанных с лечением больных ГЛПС (т.е. фактическая “стоимость” этого заболевания для общества и индивидуума) [102 - 105]. На лечение больных ГЛПС расходуются огромные средства, существенно превышающие бюджетные затраты на другие инфекции. Так,

прямые медицинские затраты на лечение одного больного ГЛПС в России оцениваются, согласно различным источникам, от 20 до 30 тысяч рублей, включая: оплату диагностических мероприятий, длительного (3-4 недели и более) стационарного лечения, в том числе и с применением гемодиализа (подключение к аппарату искусственной почки), лабораторных и инструментальных исследований, зарплаты участвующего в обследовании, лечении и реабилитации медицинского персонала, а также оплату ряда немедицинских услуг (транспорта, питания и др.). Непрямые затраты, как правило, превышают прямые в 2-3 раза и составляют 40 – 60 тысяч рублей на лечение одного больного ГЛПС. Они связанны, в основном, с не произведенной продукцией вследствие снижения или утраты трудоспособности, а нередко – и преждевременной смертью больных. Большинство переболевших ГЛПС больных, утративших трудоспособность, с учетом несовершенной и малобюджетной системы реабилитации в нашей стране, очень редко имеют возможность быстрого адекватного восстановления утраченных функций. Учреждения, занимающиеся лечебной реабилитацией, на практике оказываются мало доступными для больных из–за значительного сокращения в последние годы их количества и высокой стоимости услуг. В результате забота о лечении и реабилитации в большинстве случаев оказывается частной задачей больного и его семьи. То есть, непрямые затраты из–за потерянных и неоплаченных рабочих дней у лиц, ухаживающих за больным членом семьи также могут быть весьма значительными. Если говорить о нашей стране, то социально-экономические потери усугубляются тем, что из числа заболевших ГЛПС до 85% составляют мужчины в возрасте от 20 до 40 лет, то есть наиболее демографически, экономически и социально продуктивная часть населения, несущая большую долю ответственности за финансовую поддержку и заботу о других. Значение выхода из строя этих людей простирается далеко за пределы семьи, проявляясь в истощении трудовых ресурсов отраслей хозяйства, в снижении производительности труда и накоплений, необходимых для капиталовложений, демографических последствиях. Третью группу расходов в объеме общих материальных затрат составляют т.н. “дополнительные” затраты, которые достаточно сложно рассчитать, т.к. они обусловлены психоэмоциональными переживаниями пациента, физическими и моральными страданиями, возникающими материальными, семейными проблемами, т.е. фактически для больного это ”цена” снижения качества жизни. Таким образом, материальные затраты, связанные с лечением одного больного ГЛПС составляют ориентировочно 60-90 тысяч рублей. Соответственно, с учётом средней ежегодной заболеваемости в России (10 000 больных) затраты могут составить более 600 миллионов рублей. Сумма для нашего бесплатного здравоохранения весьма ощутимая. Следует сказать также о том, что из всего комплекса мер неспецифической профилактики ГЛПС наиболее часто применяемой остается дератизация и 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 миллионов рублей на каждую область. Вместе с тем, дорогостоящие дератизационные мероприятия обеспечивают лишь кратковременное снижение численности грызунов на обработанных территориях и вовсе не могут решить проблему полной ликвидации природного резервуара вируса-возбудителя ГЛПС [3].

Таким образом, затронутые выше проблемы по своей сути носят социально-экономическую направленность, в связи с чем они должны решаться комплексно на государственном уровне, включая разработку вакцинопрофилактики ГЛПС. Так, при ориентировочной стоимости 1 дозы вакцины 200 рублей, затраты на проведение полной трёхкратной вакцинации одного человека составят, приблизительно 700 рублей, т.е. в 100 раз меньше затрат на лечение. Создание вакцины против ГЛПС и ее широкое внедрение в практику здравоохранения позволит в значительной степени уменьшить тяжесть социально-экономических последствий, связанных с высокой заболеваемостью ГЛПС, сопровождающейся нередко летальным исходом [3]. Результаты анализа структуры заболеваемости ГЛПС и иммунного статуса здорового населения по отношению к возбудителю этой инфекции в России свидетельствуют о том, что показания к вакцинации против ГЛПС не могут быть ограничены определенной группой повышенного риска и, практически, в равной степени распространяются на все профессиональные группы городского и сельского населения эндемичных территорий.

Население эндемичных территорий, нуждающееся в вакцинопрофилактике этой инфекции составляет только в России около 20 миллионов человек, что обусловливает высокую коммерческую ценность вакцины и, соответственно, значительную финансовую прибыль от реализации вакцины [3].

Кандидатная поливалентная вакцина для профилактики ГЛПС успешно прошла комплексные доклинические испытания, что может явиться основанием для проведения клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы биотехнологические этапы изготовления поливалентной (на основе отечественных штаммов 3-х хантавирусов) инактивированной вакцины против ГЛПС, не имеющей аналогов в мире.

2. Результаты доклинических исследований являются доказательством безопасности и высокой иммуногенной активности вакцины ГЛПС-Вак. Вакцина индуцирует выработку нейтрализующих антител по отношению к каждому из составляющих её вирусов – возбудителей ГЛПС у 100% мышей BALB/c.

3. Вакцина не токсична при испытании на аутбредных белых мышах и морских свинках как при однократном, так и при повторных введениях в дозах, суммарно значительно превышающих вакцинирующие для человека.

4. Не выявлено иммунотоксического влияния вакцины на В-клеточный и Т-клеточный иммунитет на модели мышей линии CBA, а также проявлений аллергизации, вызванных введением вакцины морским свинкам.

5. Вакцина не нарушает репродуктивную функцию экспериментальных животных и не оказывает эмбриотоксического воздействия при длительном введении крысам в дозах, суммарно значительно превышающих вакцинирующие для человека.

6. Вакцина не проявляет мутагенных свойств в тесте Эймса на тестерных штаммах Salmonella typhimurium.

7. Разработаны протоколы доклинических исследований вакцины против ГЛПС, а также соответствующие нормативно-технические документы, включая проекты опытно-промышленного регламента, фармакопейной статьи предприятия, инструкции по применению вакцины, брошюры исследователя и протокола клинического исследования.

8. Результаты доклинических исследований могут быть основой для перехода к I фазе клинических испытаний поливалентной вакцины ГЛПС-Вак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ	-	антиген
АКА	-	активная кожная анафилаксия
АТ	-	антитела
в/м	-	внутримышечное введение
ГЗТ	-	гиперчувствительность замедленного типа
ГЛПС	-	геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
ГЛПС-Вак	-	кандидатная тривалентная вакцина для профилактики ГЛПС
ИФА	-	иммуноферментный анализ
ИР	-	индекс реакции
Комби-Вак	-	кандидатная бивалентная вакцина для профилактики ГЛПС
КП	-	конъюнктивальная проба
М	-	Male (мужской)
МК	-	массовый коэффициент
МФА	-	метод флюоресцирующих антител
ОТ-ПЦР	-	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
п/к	-	подкожное введение
РН	-	реакция нейтрализации вируса антителами
ФОЕ	-	фокус образующие единицы, представляют собой колонии инфицированных хантавирусами клеток
физ. р-р	-	физиологический раствор NaCl
ТД	-	терапевтическая доза
ЭБ	-	эритроциты барана
F	-	Female (женский)
GLP	-	«Good Laboratory Practice»
M	-	Male (мужской)
M ± m	-	среднее ± стандартная ошибка среднего
MHC	-	Major Histocompatibility Complex (Главный комплекс гистосовместимости)
N,n	-	количество животных
Vero	-	перевиваемая культура клеток почек зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Синюгина, А. А. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок / Синюгина А. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К. [и др.]. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18. – № 5. – С. 98 - 108. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-96-108

2. Синюгина, А. А. Доклинические исследования поливалентной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Синюгина А. А., Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А. А. [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18. – № 4. – С. 52 - 58. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-52-58

3. Ткаченко, Е. А. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К. [и др.]. // Ремедиум. – 2015. – №6. – С. 47 - 54.

4. Lee, H. W. Development of a vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome / Lee H.W., Ahn C. N. // J Korean Soc. Virol. –1988. – Vol. 18 – P. 143 - 148.

5. Yamanishi, K. Development of inactivated vaccine against virus causing hemorrhagic fever with renal syndrome / Yamanishi K., Tanishita O., Tamura M. [et al.]. // Vaccine. – 1988. – N 6. – P. 278–282.

6. Song, G. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell vaccine against HFRS / G. Song, Y. C. Huang, C. S. Hang // Vaccine. – 1992. – N 10 – P. 214 - 216.

7. Cho, H. W. Antibody response in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax) / H. W. Cho, C. R. Howard // Vaccine. – 1999. – Vol. 17. – P. 2569 - 2575.

8. Li, Z. The assessment of hantaan virus-specific antibody responses after the immunization program for hemorrhagic fever with renal syndrome in Northwest China / Li Z., Zeng H., Wang Y. [et al.]. // Hum. Vaccin. Immunother – 2017. – N 13. – P. 802 - 807. DOI:10.1080/21645515.2016.1253645.

9. Jung, J. Protective effectiveness of inactivated hantavirus vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome / Jung J., Ko S. J., Oh H. S. [et al.]. // Infect. Dis. – 2018. – N 217. – P. 1417 - 1420. DOI: 10.1093/infdis/jiy037.

10. Liu, X. Changes of HFRS incidence caused by vaccine intervention in Yichun City, China 2005–2013 / X. Liu, T. Zhang, Ch. Xie // Med. Sci. Monit. – 2016. – Vol .22. – P. 295 - 301. DOI: 10.12659/MSM.895886.

11. Е. А. Ткаченко, А. А. Ишмухаметов, Т. К. Дзагурова, П. Е. Ткаченко. Глава 5. Современные технологии конструирования вакцин для профилактики хантавирусных лихорадок. В кн. Современные вакцины: технологии разработки и области применения. Пер. с англ. под ред. А. А. Ишмухаметова. М: ООО «ГРУППА РЕМЕДИУМ» 2017. – С. 103 - 147. ISBN 978-5-906499-28-8. DOI: 10.21518/978-5-906499-28-8.

12. Ткаченко, Е. А. Разработка экспериментальной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Набатников П. А. [и др.]. // Медицинская вирусология. – 2009.– Т. 26. –С. 194 - 196.

13. Бархалёва, О. А. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Бархалёва О. А., Воробьёва М. С., Ладыженская И. П. [и др.]. // Биопрепараты. –2011. – №1. – С. 27 - 30.

14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Гл. 1. – С. 13 - 25.

15. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Гл. 2. – С. 51 - 63.

16. ГОСТ 33215 — 2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Межгосударственный стандарт. – М : Стандартинформ, 2016. – 19 с.

17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. ─ Гл. 3. – С. 64 - 80.

18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. ─ Гл. 4. – С. 87.

19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. ─ Гл. 5. – С. 88.

20. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series. Annex 1, No. 927. – 2005.

21. Kruger, D. H. Hantaviruses - Globally emerging pathogens / D. H. Kruger, L. T. M. Figueiredo, J-W. Song, B. Klempa // Journal of Clinical Virology. – 2015. – Vol. 64. – P. 128 - 136.

22. Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) [Электронный ресурс] − режим доступа: http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp.

23. Дзагурова, Т. К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: этиология, специфическая лабораторная диагностика, разработка диагностических и вакцинных препаратов: специальность 03.02.02 вирусология: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Т. К. Дзагурова; Ин-т полиомиелита и вирус. энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН. - Москва, 2014. – 235 с.

24. Mackow, E. R. Hantavirus regulation of endothelial cell functions / E. R. Mackow, I. N. Gavrilovskaya // Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 102 – N 6. – P. 1030 - 41.

25. Ткаченко, Е. А. Сравнительный анализ эпидемических вспышек ГЛПС, вызванных вирусами Пуумала и Добрава/Белград / Ткаченко Е. А., Бернштейн А. Д., Дзагурова Т. К. [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2005. – Т. 4 – № 23. – С. 28 - 34.

26. Ткаченко, Е. А. Эпизоотологические и вирусологические особенности природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края / Ткаченко Е. А., Окулова Н. М., Морзунов С. П. [и др.]. // Вопросы вирусологии. ─ 2005. ─ № 3. ─ С. 14-19.

27. Ткаченко, Е. А. Актуальные проблемы современного этапа изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России / Ткаченко Е. А., Бернштейн А. Д., Дзагурова Т. К. [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2013. – №1. – С. 51 - 58.

28. Ткаченко, Е.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения) / Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Бернштейн А. Д. [и др.]. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. – №3. – С. 23 - 34.

29. Klempa, B. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by two distinct lineages of Dobrava hantavirus emerging in Russia / Klempa B., Tkachenko E., Dzagurova T. [et al.]. // Emerging Infectious Diseases Journal. – 2008. – Vol. 14 – N 4. – P. 617 - 625.

30. Oya, A. Japanese encephalitis vaccine: the vaccination / A. Oya // International Medical Foundation of Japan. – 1976. – P. 69 - 72.

31. Lee, H.W. Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans / Lee H.W., Ahn C. N., Song J. W. [et al.]. // Arch. Virol. – 1990. – Vol. 1(Suppl 1). – P. 35 - 47.

32. Ким, Р. Специфическая профилактика ГЛПС в КНДР / Ким Р., Ру Ч., Ким Г. М. [и др.]. // Тезисы международного симпозиума по ГЛПС. Ленинград. – 1991. – С. 16 - 17.

33. Kim, R. Antibody formation and epidemiological preventive effect after vaccination with the inactivated vaccine against HFRS / Kim R., Ryu C., Kim G. [et al.]. // In: Abstract of 2-nd symposium on arboviruses in the Mediterranean countries. – Dubrovnik. – 1989. – P. 58.

34. Kim, R. J. The special prevention of HFRS in P.D.R of Korea / R. J. Kim, C. Ru, G. M. Kim // Chin. Clin. Exp. Virol. – 1991. – N 4. – P. 487 - 492.

35. Sun, Z. Studies on the purified inactivated epidemic hemorrhagic fever vaccine / Z. Sun, Y. Yu, W. Wang, D. Wang // Clinical trial of type 1 EHF vaccine in volunteers // In: Abstract of 2nd international conference on HFRS. – Beijing. –1992. –P. 109 - 110.

36. Yu, Y. X. Comparative studies on the immunogenicity of different types of HFRS inactivated vaccines / Yu Y. X., Dong G. M., Yao X. J. [et al.]. // Virol. Sin. – 1990. – N 1. – P.63 - 66.

37. Astakhova, T. The elaboration of inactivated vaccine against HFRS / Astakhova T., Slonova R., Minskaya L. [et al.]. // In: Abstract of 3rd international conference on HFRS and hantaviruses. – Helsinki. – 1995. – P. 62.

38. Yu, Y. X. Antibody response of inactivated HFRS vaccine to homologous and heterologous types of the virus / Yu Y. X., Yao X. J., Dong G. M. [et al.]. // Chin. J. Biol. – 1990. – N 3. – P. 14 - 16.

39. Sohn, Y. M. Primary humoral immuno responses to formalin inactivated hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine (Hantavax): consideration of active immunization in South Korea / Sohn Y. M., Rho H. O., Park M. S. [et al.]. // Yonsei. Med. J. – 2001. – Vol. 42. – P. 278 - 284.

40. Cho, H. W. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses / H.W. Cho, C.R. Howard, H.W. Lee // Intervirology. – 2002. – Vol. 45. – P. 328 - 333.

41. Lee, H. W. Vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome / Lee H. W., Chu Y. K., Woo Y. D. [et al.]. // Elsevier. – 1999. – P. 267 - 272.

42. Bozovic, B. Follow-up of immune response of the vaccines by Hantavax vaccine in endemic foci of hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia / Bozovic B., Lee H. W., Samardzic S. [et al.]. // In: Abstract of 5-th international conference on HFRS, HPS and hantaviruses. Veyrier-du-Lac. – France. – 2001. – P. 235.

43. de Carvalho, N. C. Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses / de Carvalho N. C., Gonzalez D., Valle M. [et al.]. // Virology. – 2002. – Vol. 76. – N 13. – P. 6669 - 6677.

44. Dargeviciute, A. Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model / Dargeviciute A., Brus S. K., Sasnauskas K. [et al.]. // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – P. 3523 - 3531.

45. Lee H. W. Immune reaction of the vaccinated hamster with combination Hantaan-Puumala vaccine / Lee H. W., Chu Y. K., Cui Y. S. [et al.]. // J. Korean Soc. Virol. – 1997. – Vol. 27. – P. 39 - 47.

46. Hwang, Y. H. Toxic epidermal necrolysis with ocular involvement following vaccination for hemorrhagic fever with renal syndrome / Y. H. Hwang, M. S. Kang, K. O. Lim, S. M. Lee // Yonsei. Med. J. – 2012. – Vol. 53. – N 1. – P. 228 - 230.

47. Song, G. Human trial of a bivalent inactivated GHKC vaccine against HFRS / G. Song, Y. Huang // In: Abstract of 2-nd international conference on HFRS. Beijing. – 1992. – P. 103.

48. Dong, G. Efficacy of a chicken embryo tissue culture inactivated HFRS vaccine used in a clinical trial / G. Dong, Q. An, Y. Zhihue, L. Wenxue // In: Abstract of 5-th international conference on HFRS, HPS and hantaviruses. – France. – 2001. – P. 239.

49. Choi, Y. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells / Choi Y., Ahn C. J., Seong K.M. [et al.]. // Vaccine. – 2003. – Vol.21. – P.1867 - 1873.

50. Li, D. Vaccines against hantaviruses in China / D. Li, G. Dong // In: Abstract of 5-th international conference on HFRS, HPS, and hantaviruses. Veyrier-du-Lac. – France. – 2001. – P. 121.

51. Zhao, T. G. Effective appraisement of inactivated vaccine against HFRS prepared from Meriones unguiculatus and Alaetagulus pumillio kerr kidney culture / T. G. Zhao, S. Ying [et al.]. // In: Abstract of 4-th international conference on HFRS and hantaviruses. – Atlanta. –1998. – P. 104.

52. Liu, W. M. Comparative studies on inactivating methods for production of inactivated cell culture vaccine against epidemic hemorrhagic fever / W. M. Liu, G. Song, Q. F. Zhang // Chin. J. Virol. – 1992. – N 3. – P. 141–146.

53. Hang, C. S. Advances on development of purified bivalent vaccine against HFRS prepared on Vero cells / Hang C. S., Xie Y. X., Wang S. W. [et al.]. // In: Abstract of 6-th international conference on HFRS, HPS and hantaviruses. – Seoul. – 2004. – P. 152.

54. Hao, F. Y. Efficacy test for inactivated epidemic hemorrhage fever vaccine using golden hamsters / Hao F. Y., Hui L. G., Zhao X. L. [et al.]. // Chin. J. Biol. – 1996–N 9. – P.69 - 72.

55. Ren, K. Serological efficacy of the inactivated golden hamster kidney cell vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in human trial / Ren K., Lu Q. X., Song G. [et al.]. // Chin. J. Exp. Clin. Virol. – 1996. – N 10. ─ P.10 - 15.

56. Zhu, Z. Y. Efficacy of inactivated EHF vaccine in clinical trial / Z. Y. Zhu, R. F. Zeng, X. Y. Yu // Virol. Sin. – 1991. – N 6. – P. 315 - 319.

57. Yu, Y. X. Neutralizing antibody response in humans immunized with Meriones gerbil kidney tissue culture inactivated HFRS vaccine assessed by two methods / Y. X. Yu, W. X. Liu, Z. L. Nei // Virol. Sin. – 1992. – N 7. – P. 176 - 180.

58. Chen, H. X. Evaluation of the efficacy of vaccines against HFRS and study on their antibody dependent immunization enhancement and immunological strategy / H. X. Chen, N. Wang, Y. Zhang // In: Abstract of 4-th international conference on HFRS and hantaviruses. – Atlanta. – 1998. – P. 87.

59. Li, D. Trends of HFRS epidemiology and the expanded program on immunization with hantavirus vaccines in China / D. Li // In: Abstract of 8-th international conference on HFRS HPS and hantavirus. – Athens. – 2010. – P. 82.

60. Zhang, Y. Z. Hantavirus infections in humans and animals, China / Y. Z. Zhang, Y. Zou, Z. F. Fu, A. Plyusnin // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – N 8. – P.1195 - 1203.

61. Schmaljohn, C. S. Vaccines for hantaviruses: progress and issues / C. S. Schmaljohn // Expert Rev. Vaccines. – 2012. – N 5. – P.511 - 513.

62. Chu, Y. K. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus / Y. K. Chu, G. B. Jennings, C. S. Schmaljohn // J. Virol. – 1995. – N 10. – P.6417 - 6423.

63. Schmaljohn, C. Vaccines for hantaviruses / C. Schmaljohn // Vaccine. – 2009. – M 27. – P. 61 - 64.

64. Дзагурова, Т. К. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов-возбудителей ГЛПС в Европейской части России / Дзагурова Т. К., Ткаченко Е. А., Башкирцев В. Н. [и др.]. // Медицинская вирусология. – 2008. – Т. 25. – С. 142 - 150.

65. Klempa, B. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia / Klempa B., Tkachenko E. A., Dzagurova T. K. [et al]. // Emerg. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 14. – P. 617 - 625.

66. Дзагурова, Т. К. Этиологическая роль генотипов вируса Добрава в структуре заболеваемости ГЛПС / Дзагурова Т. К., Морозов В.Г., Юничева Ю. В. [и др.]. // Медицинская вирусология. –2009. – Т. 26 – Р. 165 - 167.

67. Дзагурова, Т. К. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Дзагурова Т. К., Солопова О. Н., Свешников П. Г. [и др.]. // Вопросы вирусологии. – 2013. – N 1. – С. 40 - 44.

68. Schmaljohn, C. Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for HFRS / C. Schmaljohn, S. Hasty, J. Dalrymple // Vaccine. – 1992. – N 10. – P. 10 - 13.

69. Kamrud, K. Evaluation of naked DNA and alphavirus-based hantavirus vaccines / Kamrud K., Nelle T., Van der Zanden L. [et al.]. // In Abstracts of 4-th Intern. Confer. on HFRS and Hantaviruses. –Atlanta. – 1998. – P. 95.

70. Hooper, J. Development and testing of DNA vaccines against hantaviruses / Hooper J., Kamrud K., Elgh F. [et al.]. // Am. J. of Trop Med. and Hyg. Supplement. – 1998. – N 3. – P.124 - 125.

71. Bharadwaj, M. Genetic immunization with Sin Nombre virus cDNAs induces T cell proliferative responses and antibodies in BALB/c mice / M. Bharadwaj, C. Lyons, B. Wortman, B. Hjelle // Am. J. of Trop Med. and Hyg. Supplement. – 1998. – N 3. – P. 124.

72. Yoshimatsu, K. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins / Yoshimatsu K., Yoo Y. C., Yoshida R. [et al.]. // Arch. Virol. –1993. – Vol. 130. –P. 365 - 376.

73. Schmaljohn, C. S. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants / C. S. Schmaljohn, Y. K. Chu, A. L. Schmaljohn, J. M. Dalrymple // Virology. – 1990. – N 7. – P. 3162 - 3170.

74. McClain, D. J. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine / McClain D. J., Summers P. L., Harrison S. A. [et al.]. // J. Med. Virol. – 2000. – Vol. 60. – P. 77-85.

75. Hammerbeck, C. D. Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases / C. D. Hammerbeck, V. Wahl-Jensen, J. W. Hooper // In: Barrett ADT, Stanberry LR (eds.) Academic Press / Elsevier. London. – 2009. – P. 379 - 412.

76. Safronetz, D. Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with Andes virus / Safronetz D., Hegde N. R., Ebihara H., Denton M. [et al.]. // J. Virol. – 2009. – Vol. 83. – P. 7285 - 7295.

77. Yuan, Z. G. A single immunization with a recombinant canine adenovirus type 2 expressing the Seoul virus Gn glycoprotein confers protective immunity against Seoul virus in mice / Yuan Z. G., Li X. M., Mahmmod Y. S. [et al.]. // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 5247 - 5251.

78. Yuan, Z. G. Generation of E3-deleted canine adenovirus type 2 expressing the Gc glycoprotein of Seoul virus by gene insertion or deletion of related terminal region sequences / Yuan Z. G., Luo S. J., Xu H. J. [et al.]. // J. Gen. Virol. – 2010. – Vol. 91. – P. 1764 - 1771.

79. Giese, M. DNA-antiviral Vaccines: New developments and Approaches – a review / M. Giese // Virus Genes. – 1998. – N 3. – P. 219 - 232.

80. Lai, W. C. DNA vaccines / W. C. Lai, M. Bennett // Crit. Rev. Immunol. – 1998.– N 5.– P. 449 -484.

81. Hooper, J. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects Seoul virus infection / Hooper J., Kamrud K., Elgh F. [et al.]. // Virology. – 1999. – Vol. 255. – P. 269 - 278.

82. Kamrud, K. Comparison of the protective efficacy of naked DNA, DNA-based Sindbis replicon, and packaged Sindbis replicon vectors expressing hantavirus structural genes in hamsters / K. Kamrud, J. Hooper, F. Elgh, C. Schmaljohn // Virology. – 1999. – Vol. 263. – P. 209 - 219.

83. Boudreau, E. Phase 1 clinical study on the safety, tolerability and immunogenicity of Hantaan and Puumala DNA vaccines / Boudreau E., Sellers K., Rusnak J. [et al.]. // In: Abstracts of the 8-th international conference on HFRS HPS and hantavirus. – Athens. – 2010. – P. 83.

84. Filatov, F. Immune response to aerosol delivery of the cloned hantavirus genes / Filatov F., Tkachenko E., Schmaljohn C. [et al.]. // In: Abstracts of 7-th international conference on HFRS, HPS and hantaviruses. – Buenos Aires – 2007. – P. 187.

85. Boudreau, E. F. A Phase 1 clinical trial of Hantaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for hemorrhagic fever with renal syndrome / Boudreau E. F., Josleyn M., Ullman D. [et al.]. // Vaccine. ─2012. – Vol. 30. – P. 1951 - 1958.

86. Zhao, C. Immunogenicity of a multiepitope DNA vaccine against hantavirus / Zhao C., Zhao Y. S., Wang S. [et al.]. // Hum. Vaccines Immunother. – 2012. – N 2. – P. 208 - 215.

87. Schmaljohn, C. S. DNA vaccines for HFRS: laboratory and clinical studies / C. S. Schmaljohn, K. W. Spik, J. W. Hooper // Virus Res. – 2014. – Vol. 187 – P. 91 - 96.

88. Kwilas, S. A hantavirus pulmonary syndrome (HPS) DNA vaccine delivered using a spring-powered jet injector elicits a potent neutralizing antibody response in rabbits and nonhuman primates /

Kwilas S., Kishimori J. M., Josleyn M. [et al.]. // Current Gene Therapy. – 2014. – Vol. 14. – P. 200 - 210.

89. McCoy, J. R. A multi-head intradermal electroporation device allows for tailored and increased dose DNA vaccine delivery to the skin / McCoy J. R., Mendoza J. M., Spik K.W. [et al.]. // Hum. Vaccine Immunother. – 2015. – N 3. – P. 746 - 754.

90. Hooper, J. W. Phase 1 clinical trial of Hantaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation / Hooper J. W., Moon J. E., Paolino K. M. [et al.]. // Clin. Microbiol. Infect. – 2014. – N 5. – P. 110 - 117.

91. Cichutek, K. DNA vaccines: development, standardization and regulation / K. Cichutek // Intervirology. – 2000. – Vol. 43. – P. 331-338.

92. Haese, N. Antiviral biologic produced in DNA vaccine/ goose platform protects hamsters against hantavirus pulmonary syndrome when administered post-exposure / Haese N., Brocato R. L., Henderson T. [et al.]. // PLOS Neglected Trop Dis. – 2015. – P. 1 - 19.

93. Hooper, J. W. DNA vaccine–derived human IgG produced in transchromosomal bovines protect in lethal models of hantavirus pulmonary syndrome / Hooper J. W., Brocato R. L., Kwilas S. A. [et al.]. // Sci. Transl. Med. – 2014. – N 6. – P. 264-70.

94. Kobak, L. Hantavirus-1 induced pathogenesis in mice with a humanized immune system / Kobak L., Raftery M. J., Voigt S. [et al.]. // J. Gen. Virol. – 2015. – Vol. 96 – P. 1258 - 1263.

95. Hjelle, B. Vaccines against hantaviruses. / B. Hjelle // Expert Rev. Vaccines – 2002. – N 1.– P. 373 - 384.

96. Requirements for hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) vaccine (inactivated). // WHO Technical Report No 845. – 1999. – P. 53 - 79.

97. WHO Technical Report Series, No.848. – 1994.

98. Lee, H. W. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever / H. W. Lee , P. W. Lee, K. M. Johnson // J. Infect. Dis. – 1978. – Vol. 137. – P. 298-308.

99. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. N 51.

100. Дзагурова. Т. К. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов-возбудителей ГЛПС в Европейской части России / Дзагурова Т. К., Ткаченко Е. А., Башкирцев В. Н. [и др.]. // Медицинская вирусология. – 2008. – Т. XXV. – С. 142 - 150.

101. Дзагурова, Т. К. Обнаружение и клинико-этиологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в субтропической зоне Краснодарского края / Дзагурова Т. К., Ткаченко Е. А., Юничева Ю. В. [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – №1. – С. 12 - 16.

102. Шаханина, И. Л. Экономическая оценка вакцинопрофилактики ветряной оспы на примере Москвы / И. Л. Шаханина, А. В. Горелов, И. Н. Лыткина, А. Г. Толкушин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 3. – С. 49 - 57.

103. Инфекционная заболеваемость в РФ в 2006-2007 гг.: (Информ. Сборник стат. и аналит. материалов). – Москва. – ФЦГСЭН Минздрава РФ. – 2007.

104. Ориентировочные сроки временной нетрудоспособности при наиболее распространённых заболеваниях и травмах (в соответствии с МКБ-10). Минздрав РФ № 2510/9362-34, ФСС РФ № 02-08/10-1977П от 21.08.2000. – Москва. – 2000.

105. Костинов, М. П. Экономическая эффективность вакцинации против ротовирусной инфекции в Российской Федерации / М. П. Костинов, В. В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – №3. – С. 50 - 55.