© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.371:578.2+578.833.2

Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин клещевого энцефалита ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский

М. С. Воробьева[1], Г. М. Игнатьев[2], Н. А. Нетесова[3], Е. В. Отрашевская[4], Н. Х. Ставицкая[5], М. С. Щербинина[1], К. А. Саркисян[1], В. А. Шевцов[1], А. В. Рукавишников[1], В. П. Бондарев[1]

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2*
[2] *Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» ФМБА России, 198320, Российская Федерация, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52*
[3] *НПО «СибЭнзим», 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2/12*
[4] *Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Российская Федерация, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10*
[5] *Филиал федерального государственного унитарного предприятия «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации «НПО «Вирион», 634040, Российская Федерация, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8*

Поступила 04.10.2016 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Представлены результаты многолетнего изучения биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, используемого в ФГУП «НПО «Микроген» для производства культуральных инактивированных очищенных сорбированных вакцин клещевого энцефалита: ЭнцеВир (для вакцинации взрослых) и ЭнцеВир Нео детский (для вакцинации детей). Биологическую стабильность штамма № 205 изучали на этапах получения посевных серий вируса при пассажах на аутбредных белых мышах: исходный производственный штамм № 205, производственный «штаммовый запас». Лиофилизаты производственных посевных серий изучали на различных сроках хранения при температуре минус 20 °С (до 9 лет и более). Определяли показатели биологической активности (титры вируса клещевого энцефалита (КЭ) в lg LD_{50}/мл) при различных способах заражения аутбредных белых мышей, а также определяли подлинность (специфичность) штамма № 205 по отношению к эталонному в реакции биологической нейтрализации (РБН) в соответствии с требованиями фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на вышеуказанные вакцины КЭ. Эти же материалы, а также одну из серий вакцины КЭ, полученной на основе производственного «штаммового запаса» вируса КЭ штамма № 205 (лиофилизат 1986 г.), изучали на сохранность генетической стабильности в процессе пассирования и длительного хранения методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования. Впервые показана биологическая и генетическая стабильность вируса КЭ, штамм № 205, в процессе производства вакцин КЭ.

Ключевые слова: *клещевой энцефалит; вакцинация; производство вакцин клещевого энцефалита; биологическая и генетическая стабильность; подлинность в реакции биологической нейтрализации; пассажи через мозг аутбредных белых мышей; полимеразная цепная реакция; праймеры; секвенирование.*

Библиографическое описание: *Воробьева МС, Игнатьев ГМ, Нетесова НА, Отрашевская ЕВ, Ставицкая НХ, Щербинина МС, Саркисян КА, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Бондарев ВП. Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин клещевого энцефалита ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 95–102.*

История изучения клещевого энцефалита (КЭ) насчитывает более 80 лет, однако данное заболевание остается проблемой здравоохранения стран Центральной и Восточной Европы, России, а так же Китая, Монголии и Японии [1, 2]. Распространение вируса клещевого энцефалита на двух континентах определяет его генетическое разнообразие. К настоящему времени с помощью молекулярно-генетических исследований подтверждена циркуляция в природных очагах КЭ 3 субтипов (генотипов) вируса КЭ — европейского, дальневосточного и сибирского (уралосибирского) [3–5].

Многолетний опыт организации мероприятий для защиты населения в природных очагах КЭ показал, что массовая плановая вакцинопрофилактика является наиболее активной мерой в снижении заболеваемости клещевым энцефалитом [6, 7].

Вакцины для профилактики КЭ производятся 5 предприятиями, два из которых находятся в России (ФГУП «НПО «Микроген» и ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова»), «Baxter AG вакцины» в Австрии, «Novartis-вакцины» в Германии, фирма «CIBP» в КНР [3]. Все указанные производи-

тели используют в производстве вакцин разные производственные штаммы вируса клещевого энцефалита.

Для производства вакцин КЭ (ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский) в ФГУП «НПО «Микроген» применяется в течение многих лет штамм вируса КЭ № 205 (дальневосточный подтип (генотип) вируса КЭ, в качестве субстрата накопления вируса — первично-трипсинизированная взвешенная роллерная культура клеток фибробластов эмбрионов курицы (ФЭК)).

Штамм № 205 вируса КЭ был выделен в 1973 г. из клещей *Ixodes persulcatus* в зоне хвойно-широколиственных лесов Облученского района Хабаровского края. В 1975 г. штамм № 205 вируса КЭ был передан в Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (ГИСК им. Л. А. Тарасевича), где были проведены исследования вирусного материала на соответствие биологическим и антигенным требованиям, предъявляемым к производственным штаммам вируса КЭ [1, 8, 9]. После аттестации лиофильно высушенный штамм № 205 был депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР (номер депонента ГКВ-553).

В 1978 г. штамм № 205 вируса КЭ был передан для производства вакцины КЭ в ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирион», г. Томск [1, 8]. На предприятии «Вирион» полученный лиофилизат вируса КЭ был обозначен как «эталонный штаммовый запас», разработана система ведения посевных серий штамма на этапах технологии производства вакцины. Информация об используемой при производстве вакцин КЭ системы получения посевных серий (при пассировании штамма № 205 на аутбредных белых мышах (масса тела 7–9 г)) представлена в таблице 1. Как видно из представленных в таблице 1 данных, при производстве вакцины клещевого энцефалита штамм № 205 проходит от 4 до 6 пассажей через мозг аутбредных белых мышей и один пассаж на культуре клеток ФЭК. Пассирование штамма через мозг мыши и последующий пассаж на клетках ФЭК может привести к возможным изменениям в нуклеотидной последовательности вириона, что в свою очередь может привести к изменению биологических свойств вируса. Контроль генетической стабильности производственных штаммов вирусов рекомендован ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (Гармонизированное трехстороннее руководство ICH (Качество биотехнологических средств: Испытание стабильности биотехнологических/биологических средств)) [10, 11]. Однако в отношении производственного штамма № 205 исследования генетической стабильности не проводились. Контроль посевных серий производственного штамма № 205 на соответствие регламентированным биологическим показателям проводился в ГИСК им. Л. А. Тарасевича до 2006 г.

Цель работы — анализ результатов многолетнего изучения биологической стабильности свойств производственного штамма вируса КЭ № 205 в сравнении с данными изучения современными методами молекулярной генетики образцов производственного штамма № 205 и, выборочно, одной из серий вакцины КЭ ЭнцеВир.

Материалы и методы

Определение генетической стабильности штамма проводили на образцах вируса, полученных на этапах производства вакцины на основе разных производственных «штаммовых запасов» вируса, а также на образцах готовой серии № Т018 вакцины КЭ ЭнцеВир (табл. 1).

Таблица 1. Система посевных серий производственного штамма № 205 вируса КЭ, применяемая для изготовления серий культуральных инактивированных концентрированных очищенных вакцин КЭ на предприятии ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирион», г. Томск

Эталонный «штаммовый запас», 1978 г. (лиофилизат 1978 г.). Получен из ГИСК им. Л. А. Тарасевича	Производственный «штаммовый запас» (лиофилизат). II пассаж: даты изготовления: 1. 1986 г. (из лиофилизата 1978 г.), 2. 2003 г. (из лиофилизата 1986 г.)	Маточный «штаммовый запас»	Рабочий «штаммовый запас»	Суспензия посевного вируса	Культуральная вируссодержащая жидкость для получения серии вакцины КЭ № Т018
Количество пассажей производственной суспензии мозга мышей, инфицированных вирусом КЭ штамм № 205 (от эталонного «штаммового запаса»)	1–2 пассажа через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1–2 пассажа производственного «штаммового запаса» через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1 пассаж маточного «штаммового запаса» через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1 пассаж рабочего штаммового запаса через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	Заражение ФЭК 10 % мышиной мозговой суспензи-ей посевного вируса штамма № 205
Температура и срок хранения	Лиофилизат 1) 1978 г., минус 70 °С в течение 8 лет; Лиофилизат 2) 1986 г., минус 70 °С в течение 17 лет и 25 лет; Лиофилизат 3) 2003 г. (получен из лиофилизата 1986 г.), минус 70 °С в течение 12 лет и более	минус 70 °С не более 3 месяцев	минус 20 °С не более 14 сут	минус 20 °С не более 14 сут	Мозговая суспензия посевного вируса не хранится после контроля инфекционной активности, используется сразу для заражения ФЭК

I. Изучение биологической стабильности. При изучении биологической стабильности производственного штамма № 205 проводили ретроспективный анализ результатов изучения на производстве и в ГИСК им. Л. А. Тарасевича пассажей посевных серий штамма № 205 вируса КЭ через мозг аутбредных белых мышей, масса тела 7–8 г, по показателям нейровирулентности штамма с помощью стандартного метода титрования вируса при разных методах введения мышам — в мозг (в/м), подкожно (п/к) и внутрибрюшинно (в/б). Использовали: исходный материал — лиофилизат 10 % вируссодержащей суспензии мозга инфицированных мышей (эталонный штаммовый запас, лиофилизат 1978 г.). Определение титра вируса в lg LD_{50}/мл по результатам опытов титрования проводили по методу Рида и Менча [8, 9]. Регламентированные требования к биологической активности производственного штамма № 205 изложены в общей фармакопейной статье (ОФС) на вакцину КЭ: биологическая (инфекционная) активность производственного штамма № 205 по регламентированному лимиту нормативной документации: не менее 9,0 lg LD_{50}/мл, титрование вируса при в/м заражении мышей, масса тела 7–8 г, не менее 7,5 lg LD_{50}/мл при п/к, не менее 8,5 lg LD_{50}/мл при в/б заражении мышей той же весовой категории.

Подлинность штамма № 205 вируса КЭ — типоспецифичность в РБН (реакция биологической нейтрализации на мышах): индекс нейтрализации при внутримозговом методе постановки реакции биологической нейтрализации с гипериммунной вирусспецифической кроличьей сывороткой[1] к штамму № 205 — не менее 1000.

II. Изучение генетической стабильности. Для изучения генетической стабильности штамма № 205 были использованы образцы двух серий производственного «штаммового запаса», приготовленные в 1986 г. (на основе исходного эталонного штамма № 205 — лиофилизат 1978 г.), и 2003 г. (на основе лиофилизата производственного «штаммового запаса» от 1986 г.) и образцы готовой серии вакцины КЭ № Т018.

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из образцов вируса КЭ штамма № 205 (на разных стадиях системы производственного пассирования) и из образцов готовых серий вакцины проводили с использованием набора АмплиПрайм РИБО-сорб (производства ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия). При выделении РНК из готовых серий вакцины предварительно проводили десорбцию антигена, как описано ранее [12]. Все работы по выделению РНК проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору АмплиПрайм РИБО-сорб.

Проведение ОТ-ПЦР. При проведении ОТ-ПЦР в пробирку в соответствующем порядке вносили: 11 мкл раствора выделенной вирусной РНК, 4 мкл 5-кратного реакционного буфера (производства «СибЭнзим», Россия, кат. № В312), 2 мкл 10 мМ dNTP Mix («СибЭнзим», Россия, кат. № 025), 1 мкл праймера Random 9 (0,6 OD/ml) («СибЭнзим», Россия). Смесь нагревали в амплификаторе до температуры 70 °С в течение 3 мин, затем пробирки резко помещали в лед на 2 мин. После охлаждения смеси к ней добавляли 0,1 мкл фермента М — MuLV обратной транскриптазы («СибЭнзим», Россия, кат. № Е371). Отжиг и элонгацию производили при температуре 40 °С в течение 60 мин с последующей инактивацией фермента при температуре 70 °С в течение 10 мин. Выбор праймеров, позволяющих амплифицировать последовательности генов вируса клещевого энцефалита в виде перекрывающихся последовательностей, проводили с использованием программного обеспечения VectorNTI 10.0.

Амплификацию фрагментов генов вируса КЭ проводили в условиях, подобранных для каждой пары праймеров отдельно на приборе Терцик («ДНК-Технология», Россия).

Секвенирование проводили на приборе Prism 310 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программы Chromas 2.22 («Technelysium Pty Ltd», Австралия).

Результаты и обсуждение

I. Изучение биологической стабильности штамма № 205 при длительном хранении лиофилизатов вирусной суспензии и пассировании через мозг аутбредных белых мышей

Первый производственный лиофилизат вируса (производственный «штаммовый запас») был приготовлен в 1986 г. из ампулы исходного эталонного штамма № 205, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Результаты оценки биологической активности и типоспецифичности первичного лиофилизата 1978 г. представлены в таблице 2. В таблице 3 указана биологическая активность нового

[1] Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутбредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

Таблица 2. Инфекционная активность и подлинность штамма № 205 вируса КЭ после лиофилизации в 1978 г. (результаты первичной аттестации в ГИСК им. Л. А. Тарасевича до передачи на производство вакцины КЭ)

Штамм № 205 — лиофилизат 1978 г. (из ампулы)	Инфекционная активность при различных способах введения вируса аутбредным белым мышам			Индекс нейтрализации в РБН с гипериммунной кроличьей сывороткой к штамму № 205 (лимит: индекс нейтрализации не менее 1000)
Регламентируемые показатели ОФС на вакцину КЭ	в/м — не менее 9,0lg LD_{50}/мл	п/к — не менее 7,5 lg LD_{50}/мл:	в/б — не менее 8,0 lg LD_{50}/мл:	Коэффициент индекса нейтрализации — не менее 1000
Титры вируса КЭ	9,1 lg LD_{50}/мл	8,4 lg LD_{50}/мл	7,9 lg LD_{50}/мл	1259

Примечание. 1. в/м — внутримозговое заражение по 0,03 мл; п/к — подкожное заражение по 0,1 мл; в/б — внутрибрюшинное заражение по 0,25 мл.
2. Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутбредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

Таблица 3. Анализ результатов изучения инфекционной активности и подлинности штамма № 205 после длительного хранения и пассирования (производственный «штаммовый запас» — лиофилизат 1986 г.)

Дата титрования вируса и срок хранения лиофилизата 1986 г.	Заражение мышей в мозг (по 0,03 мл)	Заражение мышей подкожно (по 0,1 мл)	Заражение мышей внутрибрюшинно (по 0,25 мл)	Подлинность (индекс нейтрализации в РБН с эталонной сывороткой крови к вирусу КЭ)
Штамм № 205 вируса КЭ (лиофилизат 1986 г.)				
Регламентируемые показатели ОФС на вакцину КЭ	Титр вируса не менее 9,0 lg LD_{50}/мл	Титр вируса не менее 7,5 lg LD_{50}/мл	Титр вируса не менее 8,0 lg LD_{50}/мл	Не менее 1000
Февраль 1987 г. (через 1 год)	10,5	9,0	9,8	6310
Февраль 1989 г. (через 3 года)	9,0	н/и	н/и	79430
Февраль 1992 г. (через 6 лет)	10,0	8,6	8,7	1585
Июнь 1995 г. (через 9 лет)	11,0	10,0	10,0	3162
Штамм № 205 вируса КЭ (лиофилизат 2003 г., получен при пассировании лиофилизата 1986 г.)				
Июль 2003 г. (после сушки)	9,0	7,6	7,9	63100
2005 г. (через 2 года)	10,0	9,3	9,9	125900
2006 г. (через 3 года)	10,0	9,6	9,2	38810

Примечание. Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутбредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

производственного запаса, полученного в виде лиофилизата в 1986 г. и в 2003 г.

В таблице 3 представлены результаты изучения инфекционной активности и типоспецифичности лиофилизатов (1986 г. и 2003 г.) после длительного хранения при температуре минус 20 °С (до 17 лет — для лиофилизата 1986 г.). Биологическая активность лиофилизатов производственного «штаммового запаса» (1986 г. и 2003 г.) сохранялась при различных способах введения аутбредным белым мышам (масса тела 7–9 г) в соответствии с регламентированными лимитами нормативной документации: не менее 9,0 lg LD_{50}/мл при титровании вируса при заражении мышей в мозг (масса тела 7–8 г), не менее 7,5 lg LD_{50}/мл при подкожном заражении и не менее 8,5 lg LD_{50}/мл при внутрибрюшинном заражении мышей той же категории.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, на различных сроках хранения установлены высокие показатели нейровирулентности: до 10,0–11,0 lg LD_{50}/мл, которые сохранялись для лиофилизатов производственного «штаммового запаса» при длительном хранении (от 3 до 9–17 лет — срок наблюдения).

Лиофилизаты производственного «штаммового запаса» вируса КЭ штамм № 205 (1986 г. и 2003 г.) хранятся на производстве вакцин КЭ до настоящего времени и используются как исходный производственный штаммовый запас для последующего пассирования через мозг мышей и заражения пассажным материалом культуры клеток ФЭК с целью получения культурального вируса КЭ — источника инактивированной культуральной вакцины КЭ (табл. 1). Лимит типоспецифичности штамма № 205 вируса КЭ должен быть (по нормативной документации на вакцину КЭ ЭнцеВир) в РБН с гипериммунной вирусспецифической антисывороткой к штамму № 205 не менее 1000. Как видно из результатов, представленных в таблицах 2 и 3, во всех случаях первичного изучения и длительного хранения лиофилизатов посевных серий штамма № 205 индексы нейтрализации всегда выше регламентированного показателя (1000). Таким образом, данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о выраженной биологической стабильности — сохранении регламентированных показателей инфекционной активности и типоспецифичности производственного штамма № 205 вируса КЭ при длительном хранении и пассировании.

II. Изучение генетической стабильности

Для изучения генетической стабильности были выбраны две области генома: 83-2619 и 3370-5393 н. (координаты по референсной последовательности ВКЭ NC 001672 из базы данных GenBank), представляющие особый интерес с иммунологической точки зрения.

Первая выбранная область генома 83-2619 н. кодирует капсидный белок С, предшественник матриксного белка prM и белок оболочки Е. Белок Е является основным иммуногеном вируса КЭ, в то время как белок prM и его зрелая производная — белок М — обеспечивают правильность укладки белка Е на поверхности вириона. Изменения в структуре белка С могут существенно влиять на вирулентность вируса [13, 14]. Вторая область генома ВКЭ 3370-5393 н. кодирует неструктурные белки NS1 (частично), NS2a, NS2b и NS3. Гексамерная форма белка NS1 секретируется из клетки и ослабляет иммунный ответ хозяина [15]. Белок NS2a также участвует в подавлении иммунного ответа путем ингибирования продукции интерферона и, кроме того, необходим для правильной сборки вирусных частиц [16]. Белки NS2b и NS3 формируют ферментативный комплекс, обладающий протеазной и хеликазной активностями и влияющий на вирулентные свойства вируса. Этот комплекс представляет собой одну из наиболее перспективных мишеней для разработки лекарственных антивирусных препаратов, направленных на ингибирование вирусных ферментов [17, 18].

Для секвенирования генов С, М, Е, NS2A, NS2B (области в геноме 83-2619 и 3370-5393 н.) вируса КЭ были выбраны, синтезированы и использованы следующие праймеры (цифры отображают позиции в геноме):

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка С

81E 5’ GCT GCC GTG GCC TGT TTC A 3’ (19)

334E 5’ CAG TCG TGA ACG TGT TGA GAA AAA GAC 3’ (27)

236E 5’ TGG ACT CGT GTT GAT GCG CAT GA 3’ (23)

1038 5’ GAG TCA CGC GAG TGG TTC CCT GA 3’ (23)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка M

816E 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(25)
1412 5' CGT ATG CGG CTC TAC TTT GAC TGT A 3'	(27)
236E 5' TGG ACT CGT GTT GAT GCG CAT GA 3'	(23)
1038 5' GAG TCA CGC GAG TGG TTC CCT GA 3'	(23)
816E 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(29)
936E 5' CCA GGC ACA AGA GCA CCA CCA C 3'	(28)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка NS2a

3689E 5' CTA TGT CGT GGC AGT TGG GAT CAC A 3'	(25)
4577 5' TTC TGA CAG CGT CCA CAA TCC CAT C 3'	(25)
3365E 5' CAC AGA GAG TGG CAA GGT GAT CCC 3'	(24)
3925E 5' GCT CTG AAA ATC AAT GCC CCC A 3'	(22)
3807E 5' CGC AGC AAC CTC ACC GTC AGA 3'	(21)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка NS2b

3689E 5' CTA TGT CGT GGC AGT TGG GAT CAC A 3'	(25)
4577 5' TTC TGA CAG CGT CCA CAA TCC CAT C 3'	(25)
4343E 5' GAC CTG CAC TGT CTC ACC TTT CCA 3'	(26)
4872E 5' GAC CTG CAC TGT CTC ACC TTT CCA 3'	(24)
4300E 5' CCG TGG CTT CGT TCC TTC TGC TTA 3'	(24)
4408E 5' ACC CGC AGG CTC ACC TCT CCA C 3'	(22)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка E

816 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(23)
1412 5' CGT ATG CGG CTC TAC TTT GAC TGT A 3'	(25)
1220 5' TGA AGA GCA CCA GAG TGG CAC A 3'	(22)
1692 5' GCC GTT CCG CAT TGT TCC A 3'	(19)
1595 5' CCT ACC GAC GGC CTG GCA GGT 3'	(21)
2064 5' CGA TTG TGG GGT TGG GTG TTA TCA A 3'	(25)
1955 5' GGA GGT TGC GTT CTC TGG GAC CAA 3'	(24)
2656 5' GCC ATT TCG AGT CTG TTT TGG GGC A 3'	(25)

При компьютерном анализе последовательности сконструированных олигонуклеотидов не образовывали стабильных вторичных структур в виде шпилек (в них отсутствовали протяженные палиндромные последовательности) и термодинамически стабильные гомо- и гетеро- (с соответствующим парным олигонуклеотидом) димеры [4].

Нами была определена первичная структура двух производственных «штаммовых запасов» штамма № 205 (1986 г. и 2003 г.) по областям генома 83-2619 и 3370-5393 н. (срок хранения лиофилизатов при температуре минус 20 °С от 4 до 13 лет и более). При сравнении первичных последовательностей секвенированных областей было показано полное отсутствие нуклеотидных замен и их полная идентичность между собой. Последовательности изученных генов выложены в GenBank: для генов белков NS1, NS2a, NS2b, NS3 — KC415176 (материал 2003 г.), для генов белков C, preM, M, E — JX987280 (материал 2003 г.).

На следующем этапе работ нами было проведено сравнение первичных последовательностей указанных областей генома вируса КЭ для маточного штамма, полученного из производственного «штаммового запаса» 2003 г., а также для маточного штамма, полученного из производственного «штаммового запаса» 1986 г. При проведении сравнительного анализа первичных последовательностей областей генома вируса КЭ (позиции в геноме 83-2619 и 3370-5393 н.) была также показана их полная идентичность последовательностям производственных «штаммовых запасов» (2003 г. и 1986 г.). Изучение нуклеотидных последовательностей материала рабочего «штаммового запаса», суспензии посевного вируса, использованных для производства серии № Т018 вакцины КЭ ЭнцеВир, также подтвердило их идентичность с производственным «штаммовым запасом» 2003 г. (KC415176, JX987280).

Таким образом, в течение 4 последовательных в/м пассажей в процессе производства вакцины КЭ на основе штамма № 205 вируса КЭ не происходит нуклеотидных замен в изучаемых генах.

При выделении РНК из готовых серий вакцины предварительно проводили десорбцию антигена, как это описано ранее [12].

Определение первичной структуры исследуемых областей генома вируса КЭ в готовой серии № Т018 вакцины КЭ ЭнцеВир, приготовленной в 2013 г., также показало полную гомологию с генетической структурой производственного «штаммового запаса» штамма № 205 (лиофилизат 2003 г.).

Выводы

1. Анализ результатов аттестации биологических свойств (в опытах титрования нейровирулентности и подлинности штамма № 205 в РБН) лиофилизатов производственного «штаммового запаса» (лиофилизаты 1986 г. и 2003 г.) штамма № 205 вируса КЭ на разных сроках длительного хранения и пассирования через мозг аутбредных белых мышей и заражения культуры клеток ФЭК подтверждает биологическую стабильность производственного штамма № 205 вируса КЭ в соответствии с регламентированными требованиями нормативной документации на вакцину КЭ. Показатели нейровирулентности при различных способах введения вируса КЭ мышам и типоспецифичности в РБН стабильны при условии выполнения разработанной системы ведения посевных серий вируса КЭ при производстве вакцин КЭ ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский на предприятии ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирион», г. Томск.

2. С помощью молекулярно-генетических методов (выделение РНК, ОТ-ПЦР, секвенирование) подтверждена стабильность генетической структуры производственного вакцинного штамма № 205 вируса КЭ, применяемого для получения вакцины КЭ ЭнцеВир, на длительных сроках хранения и пассирования. Определена первичная структура двух производственных «штаммовых запасов» (лиофилизаты 1986 г. и 2003 г.). При сравнении первичных последовательностей секвенированных областей было показано полное отсутствие нуклеотидных замен и их полная идентичность между собой.

Последовательности изученных генов выложены в GenBank.

3. Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование образцов серии № Т018 готовой формы вакцины КЭ из штамма № 205 с применением десорбции вакцинного антигена с сорбента — алюминия гидроксида. Получены идентичные результаты при исследовании генетической стабильности штаммового материала после пассажа в культуре клеток ФЭК [12].

Литература

1. *Воробьева МС, Меркулов ВА, Ладыженская ИП, Рукавишников АВ, Шевцов ВА. История создания и оценки качества современных вакцин КЭ отечественного и зарубежного производства. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (3): 40–4.*
2. *Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ. Tick-borne encephalitis virus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. Vaccines. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. P. 841–56.*
3. *Морозова ОВ. Проблемы и перспективы профилактики, диагностики и лечения клещевого энцефалита. Российский медицинский журнал 2014; 20(6): 26–31.*
4. *Pastorino BA, Peyrefitte CN, Grandadam M, Thill MC, Tolou HJ, Bessaud M. Mutagenesis analysis of the NS2B determinants of the Alkhurma virus NS2B-NS3 protease activation. J Gen Virol. 2006; 87: 3279–83.*
5. *Pöllabauer EM, Pavlova BG, Löw-Baselli A, Fritsch S, Prymula R, Angermayr R, et al. Comparison of immunogenicity and safety between two paediatric TBE vaccines. Vaccine 2010; 28(29): 4680–5.*
6. *Горбунов МА, Павлова ЛИ, Воробьева МС, Расщепкина МН, Стронин ОВ. Результаты клинических испытаний вакцины против клещевого энцефалита ЭнцеВир. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2002; (1): 64–8.*
7. *Романенко ВВ, Анкудинова АВ, Килячина АС. Эффективность программы массовой вакцинопрофилактики клещевого энцефалита в Свердловской области. Вестник УГМА 2010; (21): 125–32.*
8. *Воробьева МС, Расщепкина МН, Красильников ИВ, Мищенко ИА, Шарова ОИ, Рюмина ТА, Билалова ГП. Результаты лабораторных испытаний модифицированной вакцины против клещевого энцефалита «ЭнцеВир», производства ФГУП «ВИРИОН». В кн.: Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. Тезисы конференции, 2001. С. 8–11.*
9. *Котыков ИВ, Киселева НН, Федоров ЮВ Изучение популяции производственного штамма 205 вируса клещевого энцефалита. В кн.: Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума «Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита», 1990. С. 71–2.*
10. *Holzmann H, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, Forenczi E, Kundi M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. Vaccine 1992; 10(5): 345–9.*
11. *ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).*
12. *Андреев ЮЛ, Маева ТВ, Кедич ЛА, Золина ЕД, Куслий АГ. Физико-химическая и иммунологическая характеристика вакцины «Ген-а-ин-вак» при различных условиях хранения. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2008; (4): 26–8.*
13. *Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J Gen Virol. 1999; 80(1): 179–85.*
14. *ICH Guidance, Q5A(R1): Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin (63 FR 51074; September 24, 1998).*
15. *Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. Science 2014; 343(6173): 881–5.*
16. *Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. J Virol. 2008; 82(10): 4731–41.*
17. *Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. J Virol. 2002; 76(7): 3534–43.*
18. *Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. Virology 1989; 173(1): 291–301.*
19. *Zent O, Bröker M. Tick-borne encephalitis vaccines: past and present. Expert Rev Vaccines 2005; 4(5): 747–55.*

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Воробьева Мая Сергеевна. Главный эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.
Щербинина Мария Сергеевна. Эксперт 2-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.
Саркисян Каринэ Арташесовна. Начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.
Шевцов Владимир Александрович. Начальник управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.
Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.
Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» ФМБА России, 198320, Российская Федерация, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52.
Игнатьев Георгий Михайлович. Заместитель директора, д-р мед. наук, профессор.

Научно-производственное объединение «СибЭнзим», 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2/12.
Нетесова Нина Александровна. Заместитель директора, д-р биол. наук.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Российская Федерация, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10.
Отрашевская Елена Викторовна. Начальник отдела НИОКР.

Филиал федерального государственного унитарного предприятия «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Томске «НПО «Вирион», 634040, Российская Федерация, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8.
Ставицкая Нина Христиановна. Консультант, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Воробьева Мая Сергеевна; gisk lab@mail.ru;
Щербинина Мария Сергеевна; Shcherbinina@expmed.ru

Analysis of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 used in the production of tick-borne encephalitis vaccines EnceVir and EnceVir Neo for children

M. S. Vorobyeva[1], G. M. Ignatyev[2], N. A. Netesova[3], E. V. Otrashevskaya[4], N. Kh. Stavitskaya[5], M. S. Shcherbinina[1], K. A. Sarkisyan[1], V. A. Shevtsov[1], A. V. Rukavishnikov[1], V. P. Bondarev[1]

[1] *Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation*
[2] *Federal State Unitary Enterprise «Saint-Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera & Enterprise for Production of Bacterial Products» of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, Svobody st. 52, Krasnoe Selo, Saint-Petersburg 198320, Russian Federation*
[3] *Scientific-Production Association SibEnzyme Ltd., Academika Timakova st. 2/12, Novosibirsk 630117, Russian Federation*
[4] *Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association «Microgen» of the Ministry of Health of Russia, 2nd Volkonsky lane 10, Moscow 127473, Russian Federation*
[5] *«Virion» Tomsk Branch of the Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovskogo st. 8, Tomsk 634040, Russian Federation*

The article presents the results of a long-term study of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 which is used by the FSUE «SPA «Microgen» to produce tick-borne encephalitis vaccines EnceVir (for adults) and EnceVir Neo for children, both of which are tissue cultured, inactivated, purified, and sorbed. The biological stability of strain 205 was studied at the seed lot stage using passages on outbred white mice: initial production strain 205 and production «stock strain». Lyophilisates of production seed lots were studied at different storage intervals at –20 °C (up to 9 years of storage and more). Biological activity parameters (tick-borne encephalitis virus (TBEV) titre in log LD_{50}/ml) were studied by using different ways of infecting outbred white mice, and strain 205 identification (specificity) was determined by comparing it to a reference strain in a biological neutralization assay (BNA) according to the manufacturer's specifications for the vaccines concerned. The same materials and a batch of TBEV vaccine produced from the production «stock strain» (lyophilisate of 1986) were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for genetic stability during passaging and long-term storage. The results of the study made it possible to demonstrate the biological and genetic stability of strain 205 during production of TBEV vaccines.

Key words: *tick-borne encephalitis; vaccination; production of tick-borne encephalitis vaccines; biological and genetic stability; identification in a biological neutralization assay; outbred white mouse brain passage; polymerase chain reaction; primers; sequencing.*

For citation: *Vorobyeva MS, Ignatyev GM, Netesova NA, Otrashevskaya EV, Stavitskaya NKh, Shcherbinina MS, Sarkisyan KA, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Bondarev VP. Analysis of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 used in the production of tick-borne encephalitis vaccines EnceVir and EnceVir Neo for children. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(2): 95–102.*

References

1. *Vorobieva MS, Merkulov VA, Ladyzhenskaya IP, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA. The history and quality evaluation of tick-borne encephalitis vaccine. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2013; (3): 40–4 (in Russian).*
2. *Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ. Tick-borne encephalitis virus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. Vaccines. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. P. 841–56.*
3. *Morozova OV. Problems and prospects of prevention, diagnosis and treatment of tick-borne encephalitis. Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal 2014; 20(6): 26–31 (in Russian).*
4. *Pastorino BA, Peyrefitte CN, Grandadam M, Thill MC, Tolou HJ, Bessaud M. Mutagenesis analysis of the NS2B determinants of the Alkhurma virus NS2B-NS3 protease activation. J Gen Virol. 2006; 87: 3279–83.*
5. *Pöllabauer EM, Pavlova BG, Löw-Baselli A, Fritsch S, Prymula R, Angermayr R, et al. Comparison of immunogenicity and safety between two paediatric TBE vaccines. Vaccine 2010; 28(29): 4680–5.*
6. *Gorbunov MA, Pavlova LI, Vorobieva MS, Raschepkina MN, Stronin OB. Results of clinical trials of a vaccine against tick-borne encephalitis EnceVir. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika 2002; (1): 64–8 (in Russian).*
7. *Romanenko VV, Ankudinova AV, Kilyachina AS. The effectiveness of the program of mass vaccination encephalitis in the Sverdlovsk Region. Vestnik UGMA 2010; (21): 125–32 (in Russian).*
8. *Vorobieva MS Raschepkina MN, Krasilnikov IV, Mischenko IA, Sharov OI, Ryumin TA Bilalova GP. The results of laboratory tests of the modified vaccine «EnceVir» against tick-borne encephalitis, produced by FSUE «VIRION». In: Topical issues of development, production and use of immunobiological and pharmaceutical preparations. Abstracts of Conference, 2001. P. 8–11 (in Russian).*
9. *Kotykov IV, Kiseleva NN, Fedorov YuV. Study of the population of production strain 205 of the virus of tick-borne encephalitis. In: Abstracts of the All-Union Symposium «Modern epidemiology problems, diagnosis and prevention of tick-borne encephalitis», 1990. P. 71–2 (in Russian).*
10. *Holzmann H, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, Forenczi E, Kundi M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. Vaccine 1992; 10(5): 345–9.*
11. *ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).*
12. *Andreev YuL, Maeva TV, Kedich LA, Zolina ED, Kusliy AG. Physico-chemical and immunological characteristics of the vaccine «Hep-in-a-vak» at different storage conditions. Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment 2008; (4): 26–8 (in Russian).*
13. *Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J Gen Virol. 1999; 80(1): 179–85.*

14. *ICH Guidance, Q5A(R1): Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin (63 FR 51074; September 24, 1998).*
15. *Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. Science 2014; 343(6173): 881–5.*
16. *Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. J Virol. 2008; 82(10): 4731–41.*
17. *Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. J Virol. 2002; 76(7): 3534–43.*
18. *Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. Virology 1989; 173(1): 291–301.*
19. *Zent O, Bröker M. Tick-borne encephalitis vaccines: past and present. Expert Rev Vaccines. 2005; 4(5): 747–55.*

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.
Vorobyeva MS. Chief expert of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.
Scherbinina MS. 2nd professional category expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.
Sarkisyan KA. Head of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.
Shevtsov VA. Head of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Medical Sciences.
Rukavishnikov AV. Deputy head of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.
Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Unitary Enterprise «Saint-Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera & Enterprise for Production of Bacterial Products» of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, Svobody st. 52, Krasnoe Selo, Saint-Petersburg 198320, Russian Federation.
Ignatyev GM. Deputy director. Doctor of Medical Sciences, professor.

Scientific-Production Association SibEnzyme Ltd., Academika Timakova st. 2/12, Novosibirsk 630117, Russian Federation.
Netesova NA. Deputy director. Doctor of Biological Sciences.

Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association for Medicinal Immunobiological Products «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2nd Volkonsky lane 10, Moscow 127473, Russian Federation.
Otrashevskaya EV. Head of the R&D Department.

«Virion» Tomsk Branch of the Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association for Medicinal Immunobiological Products «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovskogo st. 8, Tomsk 634040, Russian Federation.
Stavitskaya NKh. Consultant. Doctor of Medical Sciences, professor.