

**ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ  
КОНСТРУИРОВАНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ВАКЦИННЫХ,  
ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИГЕННЫХ  
И СЫВОРОТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

*В.С. Кокорев<sup>1</sup>, О.А. Кржижановская<sup>2</sup>, И.А. Сморкалов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГУН Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, <sup>2</sup>Институт проблем управления РАН, г. Москва

Успех в решении проблемы клещевого энцефалита должен зависеть от качества применяемых антигенных и сывороточных препаратов, от разработки новых и совершенствования существующих методов их производства и применения, быстрого освоения и, главное, внедрения в практику здравоохранения.

Successful solving of the problem of tick-borne encephalitis should depend on the quality of applicable antigenic and serimal medicaments; on the development of new medications and improvement of already existing methods of their production and application; on the quick assimilation of these methods and, what is the most important thing, on their practical application.

Клещевой энцефалит (КЭ) является наиболее тяжелой и распространенной природно-очаговой инфекцией на территории России.

Несмотря на 70-летний опыт изучения и борьбы с этим заболеванием, разработку и практическое применение нескольких поколений вак-

цин, иммуноглобулинов и диагностических препаратов и тестов, заболеваемость КЭ в стране неуклонно растет. Если до 1983 г. заболеваемость в стране была на уровне 1 000—5 000 случаев, то в 1999 г. — до 10 000, а доля горожан в числе больных КЭ с 44 % в 1970 г. возросла до 70—80 % в настоящее время. Примечательно, что к 1980 г. показатели заболеваемости КЭ среди городского и сельского населения составляли соответственно 1,4 и 1,5 % на 100 000, а к 1999 г. — 6,0 и 9,02 %.

Исследователи отмечали, что рост заболеваемости КЭ и актуальные в связи с этим проблемы обусловлены все возрастающими масштабами работ по преобразованию природы и связанной с ними антропоической трансформацией ландшафтов, что влечет за собой эволюцию природных очагов КЭ. Следует добавить, что актуальность проблемы зависит не только от «преобразовательской» деятельности, но и от состояния и уровня практических и научно-исследовательских работ. В настоящее время, в силу известных причин, нет, в сущности, никакой координации исследований, неудовлетворительно финансирование исследований и материальное обеспечение, отсутствуют квалифицированные кадры арбовирусологов и т. д. и т. п. Практически все рекомендации проблемных комиссий, начиная с 1982 г., по совершенствованию методов и средств диагностики и специфической профилактики (активной и пассивной) остались нереализованными или реализованными частично. Касается это, прежде всего, поиска и внедрения в практику штаммов-продуцентов, новых критериев их выбора, рекомендаций по стандартизации как препаратов, так и методов лабораторного серовирусологического анализа. Нет эффективной службы штаммов, музеи в профильных НИИ РФ (кроме 1—2 академических) уничтожены. Рекомендации Пленума проблемной комиссии «Клещевой энцефалит и другие вирусные энцефалиты» РАМН от декабря 2003 г. повторяют аналогичные 20-летней давности, только в части научно-практических проблем добавлена актуальность генотипирования природных популяций вируса КЭ.

В конце XX в. главными критериями отбора штаммов вируса КЭ для приготовления инактивированных вакцин и диагностикумов были такие, как выделение природных популяций вируса из клещей, собранных на севере зоны хвойно-широколиственных лесов, супервирулентность, однородность популяции по гемагглютинирующей активности, высокая

инвазивность, репродуктивная активность и стабильность генетических признаков, широта антигенных связей, индексы: нейтрализации, инактивации эфиром, дезоксихолатом натрия, терморезистентности, и, наконец, устойчивость связи с ДЭАЕ-сефадксом А-50 (Л.А. Верета, М.С. Воробьева, 1990). Вакцина из штамма 205 по протективной активности превосходила все типы вакцин по восточным и западным серотипам КЭ (известным к 1990 г.), в том числе и вакцину, выпускаемую в Австрии фирмой «Иммуно» на основе штамма Найдорф, а штамм 139 был лучшим для диагностических целей. Однако, как отмечали авторы, необходимы постоянные исследования по выделению, изучению и отбору штаммов и периодическое (не менее 1 раза в 5 лет) обновление штаммов в производстве препаратов. Так же, помимо общего диагностикума, целесообразно иметь дополнительно диагностикум из уникального штамма той территории, где он выделен и вызывает особую форму заболевания. Вопрос о функциональных различиях между штаммами предстоит еще решить, но уже предполагалось, что различия связаны с олигонуклеотидными структурами различных штаммов вируса. Штамм Софьин, выделенный в 1937 г., отметили все те же авторы, был избран произвольно и по вирулентности, и по функциональной активности и не является оптимальным представителем популяции вируса КЭ. Однако, спустя 18 лет, в практике производства используют, как правило, все тот же штамм.

Мы полагаем, что указанные выше критерии отбора штаммов для производственных целей являются недостаточными, но даже указанные фенотипические маркеры никогда в полной мере не были использованы. Между тем, есть более основательные критерии оценки функциональной активности штаммов вируса КЭ с целью выбора продуцентов.

Изучение популяций вируса КЭ необходимо проводить с использованием принципов и методов более детального и глубокого структурно-функционального анализа составляющих их клонов или компонентов антигенных субстратов. Это необходимо и для конструирования препаратов, и для целей комплексной и опережающей стандартизации — как основы совершенствования вакцин, диагностикумов и сывороточных (диагностических и иммуноглобулиновых) препаратов (В.С. Кокорев, 1983, 2000).

Ведущими в этом плане должны быть прежде всего:

♦ характеристика функциональной активности производственного штамма вируса по критериям авидитета при взаимодействии с антителами и неспецифическими ингибиторами в кинетических серологических тестах;

♦ комплекс методов структурно-функционального анализа препаратов: модифицированная реакция торможения гемагглютинации, реакция истощения антигемагглютининов, ультрацентрифугирование, гель-хроматография, нехроматографические адсорбционные тесты (или суспензионной хроматографии) — на неорганические сорбенты, клеточные культуры;

♦ показатели структурно-функционального анализа популяции вируса, антигенные и иммуногенные характеристики отдельных ее компонентов;

♦ оценка способа получения антигенных препаратов по указанным выше показателям на всех стадиях изготовления и обработки полуфабриката;

♦ оценка способа получения сывороточных препаратов по соответствующим показателям: производственный штамм вируса, качество иммуногена, схема иммунизации, уровень, классы и чистота иммуноглобулинов, функциональная зрелость антител (по показателям авидитета), превентивная активность, уровень неспецифических ингибиторов;

♦ оценка возможности использования диагностических (антигенных и сывороточных) препаратов в нескольких серологических тестах;

♦ совершенствование и унификация методов применения диагностических и профилактических препаратов;

♦ оценка эффективности препаратов в широких диагностических и эпидемиологических исследованиях на КЭ.

Именно ряд таких маркеров послужил основой для более полной дифференциации авидных и неавидных вариантов вируса КЭ, депонированных нами в Музее вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, штаммы: 4072, 3745, 1524/1, 80, 1672 (номера депонентов ГКВ — 633, 634, 635, 636, 670).

В качестве примеров оценки структурных и функциональных особенностей штаммов вируса КЭ могут служить материалы, представленные в монографии В.С. Кокорева (2000).

Нельзя не отметить актуальность решения проблем:

♦ изготовления наборов диагностических препаратов, поливалентных препаратов с широким спектром функциональной активности,

«микст-препаратов» на основе использования рекомбинантных штаммов;

♦ разработки культуральных антигенных препаратов с использованием биостимуляторов, обеспечивающих наиболее полную реализацию генома в фенотипических признаках вируса;

♦ использования биофизических и биохимических методов, раскрывающих всю полноту реализации генинформации в биоматериале (скрытой) и, как следствие, — действительную функциональную активность конструируемых препаратов (ультразвук, СВЧ-поле, лазер и др., из биохимических — обработка детергентами, в частности, твин-эфиром). По всем направлениям критерии оценки качества препаратов — показатели авидитета.

Касаясь вопросов оптимизации и унификации технологических процессов при производстве вакцин и, в частности, наработки и очистки вирусной биомассы, следует обратить внимание на насущную необходимость планового, глубокого и эффективного контроля за полнотой реализации генетической информации при онтогенезе вируса в той или иной используемой в производстве биологической системе, на необходимость оценки степени гетерогенности вирусной популяции по антигенной активности составляющих ее компонентов, на использование различных типов стимуляторов репродукции с целью получения полноценного вирусного потомства и на целесообразность очистки вакцин от балластных вирусных компонентов, конкурирующих с полноценным гликопротеидным иммуногеном за рецепторы иммунокомпетентных клеток (В.С. Кокорев, 2000).

Нам представляется, что именно недостаточно интенсивная разработка вопросов биологии вируса КЭ, структуры и свойств его популяций и субпопуляций сказываются на общем состоянии решения проблемы клещевого энцефалита. Во всяком случае, в части, касающейся разработки и стандартизации противовирусных и диагностических препаратов.

Малая эффективность разработывавшихся и использовавшихся ранее вакцин, а возможно, и используемых ныне, связана, в первую очередь, не только или не столько с низким содержанием в них антигенного материала, как отмечали некоторые исследователи, но и с недостаточно четко определенными и обоснованными критериями выбора производственных штаммов вируса КЭ. Отмечено, что в настоящее время 20 % заболевших КЭ были привиты. Важнейшим вопросом в прак-

тике совершенствования вакцин против КЭ является не «изготовление этих вакцин из штаммов, составляющих антигенное ядро вируса в том регионе, где вакцины будут применяться» (Л.А. Верета, М.С. Воробьева, 1990), а прежде всего, — оценка способности вакцинного штамма вируса КЭ или тех или иных компонентов его популяции, или, наконец, субъединиц вируса индуцировать формирование высокоавидных вируснейтрализующих антител. Последнее означает, что специфичность формирующихся антител должна оцениваться не по их способности реагировать только с циркулирующими в данном районе штаммами (т. е. на уровне гомологичных реакций), а по интенсивности внутривидовых реакций, что и характеризует авидитет антител. При этом желательнее, чтобы они не обладали цитолитической активностью в отношении инфицированных клеток, что особенно важно при получении специфического гамма-глобулина из крови вакцинированных, используемого для лечения больных КЭ.

Выбор производственного вакцинного штамма по критериям авидитета формирующихся антител еще никем не проводился, разве что частично, — Л.А. Веретой и М.С. Воробьевой при выборе известного штамма 205, а между тем, методические подходы к этому и математические приемы оценки степени авидитета (его количественных характеристик) давно разработаны и применялись нами и другими исследователями (В.С. Кокорев, 1983, 2000, 2006; С.В. Колотвинов, 1979; П.Г. Мансуров, 1990; Р.Ю. Леденцова, В.С. Кокорев, Г.К. Маликов, 1979; Н.А. Шутова, 1990) при конструировании антигенных и сывороточных диагностических препаратов.

В связи с изложенным следует обратить внимание на имеющиеся в литературе данные о том, что нейтрализация флавивирусов обуславливается штаммо- и комплексреактивными (авидными) антителами, а группоспецифические антитела могут, напротив, потенцировать (при низких концентрациях) так называемое «парадоксальное усиление» инфекционности возбудителя — один из феноменов иммунопатологических реакций при вирусных инфекциях. Чрезвычайно важным является оценка специфической активности получаемых иммуноглобулинов с позиций проблемы авидитета, разработка способов повышения степени их химической чистоты, изучение вопросов иммунодепрессивного действия иммуноглобулинов. Иммунодепрессивный эффект, обусловленный

их введением, осложняет не только лабораторную диагностику КЭ, но и создает реальную возможность (на фоне подавленного гуморального иммунитета) длительной персистенции вируса в организме хозяина.

Таким образом, для конструирования и стандартизации вакцинных, сывороточных и антигенных препаратов с целью повышения их качества необходимы: либо специальный выбор условий получения максимально гомогенных и функционально активных (по критериям авидитета) вирусных популяций, либо очистка антигенных препаратов от балластных вирусных компонентов — т. е. выделение и использование фракций с оптимальными характеристиками функциональной активности.

Выбор наиболее функционально-активных фракций вируса будет целесообразен и для совершенствования серологических тестов всех «поколений», и для конструирования генно-инженерных препаратов, поиска и изучения молекулярно-генетических маркеров в качестве критериев выбора штаммов-продуцентов получаемых препаратов.

Наглядным свидетельством изложенному являются работы ряда исследователей по конструированию препаратов вируса гриппа, работы сотрудников Хабаровского НИИЭМ (Л.А. Верета с соавт.), Екатеринбургского НИИВИ (В.С. Кокорев с соавт., С.В. Колотвинов, Л.С. Субботина и др.), Томского НИИЭМ (Л.Е. Подоплека и Н.А. Шутова), Омского НИИПИ (В.С. Кокорев, П.Г. Мансуров, О.В. Наволокин), Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (С.Я. Гайдамович, Е.Э. Мельникова, Г.А. Клисенко) — по конструированию препаратов вируса КЭ, в т. ч. генно-инженерных (В.В. Распопин с соавт., 2006; А.П. Обрядина с соавт., 2008). Последним, при выявлении потенциальных диагностически значимых антигенных областей гликопротеина Е штамма Софьин, удалось показать, что рекомбинантный протеин, содержащий последовательность 296-414 а. о. белка Е, обладает наиболее выраженными антигенными свойствами: чувствительность и специфичность выявления антител к вирусу КЭ в сыворотках крови по данным ИФА составляла 100 % (!).

Следует заметить, что в настоящий период поиск молекулярно-генетических маркеров выбора «актуальных» штаммов-продуцентов для конструирования, например, ДНК-вакцин или генно-инженерных ИФА тест-систем представляет, к сожалению, чисто академичес-

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верета Л.А., Воробьева М.С. Природная гетерогенность и целенаправленный отбор штаммов вируса клещевого энцефалита. М.: Мед., 1990. 124 с.
2. Кокорев В.С. Методология повышения диагностической эффективности вирусных препаратов. Екатеринбург, 2000. 350 с.
3. Кокорев В.С. Количественная оценка показателей авидитета антигенных и сывороточных препаратов. Екатеринбург, 2006. 68 с.
4. Колотвинов С.В. Материалы по структурному анализу вирусной популяции (на модели вируса клещевого энцефалита и компьютерная модель): Дисс. канд. мед. наук. Свердловск, 1979. 220 с.
5. Мансуров П.Г. Совершенствование лабораторной диагностики клещевого энцефалита (методы и средства серовирусологического анализа): Дисс. канд. мед. наук. Омск, 1990. 174 с.
6. Обрядина А.П., Загрядская Ю.Е., Савельева Н.В. и др. Вопр. вирусол. М., 2008. № 1. С. 36—38.
7. Распопин В.В., Топычанова Н.Г., Жуков В.А. и др. Новости «Вектор-Бест». Новосибирск, 2006. № 2 (40). С. 1—4.
8. Шутова Н.А. Совершенствование и стандартизация препаратов для диагностики вирусов клещевого энцефалита и лимфоцитарного хориоменингита: Дисс. канд. биол. наук. Томск, 1990. 211 с.