

Калимолда Э.Ж., Нурпейсова А.С., Кендирбаева С.К.,
Асанжанова Н.Н., Шораева К.А., Касенов М.М.

КАНАТТУУЛАР ТУМООСУНУН АКТУАЛДУУ ШТАММДАРЫНАН АТА МЕКЕНДИК ВАКЦИНАЛАРДЫН ФИЗИКАЛЫК ЖАНА ХИМИЯЛЫК КАСИЕТТЕРИН ИЗИЛДӨӨ

Калимолда Э.Ж., Нурпейсова А.С., Кендирбаева С.К.,
Асанжанова Н.Н., Шораева К.А., Касенов М.М.

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ВАКЦИН ИЗ АКТУАЛИЗИРОВАННЫХ ШТАММОВ ГРИППА ПТИЦ

E. Kalimolda, A. Nurpeisova, S. Kendirbaeva, N. Asanzhanova,
K. Shorayeva, M. Kassenov

STUDY OF THE STABILITY OF THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF DOMESTIC VACCINES FROM UPDATED STRAINS OF AVIAN INFLUENZA

УДК: 579.62

Бул макалада канаттуулар тумоосунун жаңыртылган штаммдарынан (H5N8, H5N6, H5N9) узак мөөнөттүү сактоодо ата мекендик вакциналардын эксперименталдык сериясынын физикалык жана химиялык касиеттери – негизги көрсөткүчтөрдүн туруктуулугун аныктоо боюнча сыноолордун натыйжалары берилген. Вакцинанын сапатын контролдоо биологиялык өнөр жайда инактивдештирилген эмульсияланган вакциналарды өндүрүүдө жана контролдоодо кабыл алынган стандарттарга ылайык жүргүзүлдү. Изилденген вакциналардын изилденген үлгүлөрүнүн физико-химиялык касиеттеринин (суутек ионунун концентрациясы (pH), эмульсия туруктуулугу жана кинематикалык илешкектүүлүгү) көрсөткүчтөрү (2-8)°C температурада 12 ай бою туруктуу болоору аныкталган. Ата мекендик вакциналардын изилденген серияларынын туруктуулугун ырастоо эксперименталдык сериялар сактоонун бүткүл кепилдик мөөнөтүнүн ичинде физикалык жана химиялык касиеттери боюнча техникалык талаптарга жооп берерин көрсөтөт.

Негизги сөздөр: куш тумоосу, жаңыртылган штаммдар, вакцина, суутек ионунун концентрациясы (pH), эмульсиянын туруктуулугу, кинематикалык илешкектүүлүк.

В данной статье представлены результаты испытаний по определению стабильности основных показателей - физико-химических свойств экспериментальных серии отечественных вакцин из актуализированных штаммов гриппа птиц (H5N8, H5N6, H5N9) при длительном хранении. Контроль качества вакцины проводился в соответствии с нормативами, принятыми в биологической промышленности при производстве и контроле инактивированных эмульгированных вакцин. Установлено, что показатели физико-химических свойств (концентрации водородных ионов (pH), стабильности эмульсии и кинематической вязкости) изученных проб исследуемых вакцин остаются стабильными в течение 12 месяцев при температуре (2-8)°C. Подтверждение стабильности исследуемых серии отечественных вакцин свидетельствует о том, что экспериментальные серии соответствуют спецификациям по физико-химическим свойствам в течение всего гарантийного срока хранения.

Ключевые слова: грипп, вакцина, актуальные штаммы, вакцина, концентрация водородных ионов (pH), стабильность эмульсии, кинематическая вязкость.

The article presents the results of tests of the main indicators - physicochemical properties of domestic vaccines from updated

strains of avian influenza viruses (H5N8, H5N6, H5N9) during long-term storage. The quality control of the vaccine was carried out in accordance with the standards adopted in the biological industry for the production and control of inactivated emulsified vaccines. It is established that the indicators of physicochemical properties (concentration of hydrogen ions (pH), stability of the emulsion, kinematic viscosity) remain stable for 12 months at a temperature of (2-8)°C. Confirmation of the stability of this vaccine indicates that the production series meet the specifications for physicochemical properties during the entire shelf life.

Key words: avian influenza virus, vaccine, updated strains, the concentration of hydrogen ions (pH), stability of the emulsion, kinematic viscosity.

Введение. Вирусы птичьего гриппа требуют особого внимания при мониторинге из-за их чрезвычайной лабильности и постоянного изменения генетического материала, которые могут иметь непредсказуемые последствия [1]. С учетом явной угрозы для птицеводческой отрасли и здоровья людей в мировом масштабе, постоянная и быстрая эволюция вируса обуславливает необходимость выработки глобального подхода к контролю над распространением болезней.

Эпизоотология заболевания за последнее время характеризовалась двумя основными глобальными панзоотиями. Вспышки гриппа птиц А (H5N1) были зарегистрированы с 1997 года в Китае, Таиланде, Южной и Северной Корее и в других странах Юго-Восточной Азии. В 1997-2006 годы вспышки высокопатогенного гриппа птиц А (H5N1) были зарегистрированы в 54 странах, экономический ущерб превышал 20 млрд. долларов США. Болели разные виды птиц, иногда и люди [2-7]. В этот период вспышки высокопатогенного гриппа птиц приобрели трансконтинентальный характер, распространившись с Юго-Восточной Азии практически на все страны Евразийского [8-12] и часть Африканского континентов [13, 14].

С 2013 года наблюдается вторая панзоотическая волна с максимальной активностью в 2015 году, и она продолжается в настоящее время. Ситуация с высоко-

патогенным гриппом птиц за последние пять лет считается поистине исключительной по трем причинам: первое - значительное количество стран и территорий, пострадавших от высокопатогенного гриппа птиц у домашних птиц; второе - значительное количество вспышек (пострадавших ферм, деревень или дворов) в этот период; третье - большое разнообразие циркулирующих субтипов при вспышках болезни.

В 2017 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщает, что 68 стран мира пострадали от высокопатогенного гриппа птиц, число вспышек составляло 6946, данные вспышки были обусловлены 12 субтипами вируса. Основное различие между двумя глобальными эпидемиями - количество циркулирующих субтипов у домашних птиц, так как количество субтипов, зарегистрированных за последние пять лет, было в три раза выше, чем количество субтипов, о которых сообщалось в предыдущих глобальных эпизоотиях [15].

Успешная ликвидация птичьего гриппа в птицеводческих хозяйствах возможна только на фоне противогриппозного иммунитета. Данный факт обуславливает применение вакцины в неблагополучных хозяйствах от гриппа птиц, индуцирующих в организме птиц выработку напряженного противогриппозного иммунитета, способного противостоять заражению [16]. В современном мире ни одно государство с развитой птицеводческой промышленностью не застраховано от внезапного возникновения гриппа птиц.

Ранее на базе Научно-Исследовательского института проблем биологической безопасности в 2004-2006 годы разработана технология изготовления инактивированной эмульгированной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц, проведены производственные комиссионные испытания в условиях хозяйств республики с положительными результатами, с 2008 года налажен выпуск производственных серий инактивированной вакцины против гриппа птиц субтипа H5 [17].

Однако в настоящее время учитывая нынешнюю ситуацию назрела необходимость создания более совершенных вакцин из рекомбинантных штаммов, которые по клейдовому составу соответствуют диким штаммам вируса гриппа птиц, циркулирующих в данном регионе.

Исходя из вышеизложенного, руководство Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) обратилось к сервисным лабораториям, где созданы актуальные рекомбинантные штаммы. По результатам этих переговоров в 2017 году и позже из сервисных лабораторий ВОЗ были получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа для актуализации штаммового состава разработанной нами ранее инактивированной эмульгиро-

ванной вакцины против гриппа птиц.

Далее на базе НИИПББ были проведены работы усовершенствованию технологии изготовления инактивированной эмульгированной вакцины против гриппа птиц и были приготовлены вакцины из актуализированных штаммов гриппа птиц (A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)-PR8-IDCDC-RG42A; A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A; A/HONG-KONG/308/2014 (H9N2).

Качество вакцинного препарата характеризуется главным образом его эффективностью и безопасностью, о которых судят по показателям, определяемым физико-химическими и иммунобиологическими методами. В основном качество инактивированных гриппозных вирусных вакцин регулируется различными положениями Европейской фармакопеи и рекомендациями, выпущенные Европейским агентством по оценке лекарственных средств [18].

Одним из важных критериев для подтверждения неизменности показателей безопасности и эффективности любого иммунобиологического препарата от даты выпуска до окончания срока годности является изучение стабильности. Стабильность препарата основывается на ряде принципов, которые необходимо учитывать при производстве вакцин и при их применении в практике вакцинологии. Требования по стабильности должны предъявляться как к основным, так и вспомогательным веществам, входящим в состав препарата [19].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования было определение внешнего вида, концентрации водородных ионов, стабильности эмульсии и кинематической вязкости испытуемых вакцин через 3, 6, 9 и 12 месяцев хранения.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования данной работы является 3 экспериментальные серии вакцин из актуализированных штаммов гриппа птиц производства НИИПББ:

– 3 экспериментальные серии вакцины против гриппа птиц из рекомбинантного штамма A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A;

– 3 экспериментальные серии вакцины против гриппа птиц из рекомбинантного штамма A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)-PR8-IDCDC-RG42A;

– 3 экспериментальные серии вакцины против гриппа птиц из рекомбинантного штамма A/Hong Kong/308/2014-A/PR/8/34[R] (6+2) H9N2.

В состав инактивированных эмульгированных вакцин из рекомбинантных штаммов, входили инактивированная суспензия вируса гриппа и масляный адъювант Montanide ISA 70. Объединение полуфабрикатов и эмульгирование, а также расфасовку вакцины также проводили согласно [20].

Определение внешнего вида вакцины. Внешний вид лекарственной формы вакцины, формы фасовки, наличия посторонних примесей, плесени, целостности упаковки и укупок все емкости с вакциной определяли визуально.

Определение концентрации водородных ионов (рН). Определение концентрации водородных ионов (рН) хранящихся вакцин измеряли с помощью рН-метра Consort C931, в трёх повторностях при постоянной температуре 25°C согласно инструкции прибора. Значение рН устанавливали по трем измерениям, выводя среднее значение, допускаемые расхождения между которыми не превышали 0,1 единицы [21].

Контроль стабильности эмульсии. Контроль стабильности эмульсии определяли методом центрифугирования вакцины и термостатированием при 37,0±0,5 °C [20].

- *Метод центрифугирования.* Из трех флаконов с вакциной, после интенсивного встряхивания, отбирали по 12 мл эмульсии и переносили ее в три стеклянные центрифужные пробирки.

Пробирки с эмульсией центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин, после чего измеряли линейкой высоту столба прозрачной фракции в верхней части пробирки [20].

- *Метод термостатирования.* Проведение испытаний. Из трех флаконов с вакциной, после интенсивного встряхивания, отбирали по 10 мл эмульсии и переносили ее в три стеклянные пробирки, закрывая резиновыми пробками, ставили в штатив и помещали их в термостат, с температурой нагрева 37,0±0,5°C, далее в течение 14 суток наблюдали за проявлением прозрачной фракции в верхней части пробирки и отслоения эмульсии [20].

Определение кинематической вязкости. Определение кинематической вязкости проводили трехкратным измерением, с использованием капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 согласно наставлению к прибору и выражали данные в мм²/с [22].

Вязкость вычисляли по формуле (по среднему нескольким измерениям):

$$V = \frac{g}{9,807TK}$$

где, К – постоянная вискозиметра 0,09574/с²; Т – время истечения жидкости, с; V – кинематическая вязкость жидкости мм²/с; g – ускорение свободного па-

дения в месте измерения м/с².

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета программ «GraphPad Prism 5».

Результаты исследования и их обсуждение.

Для подтверждения показателей безопасности и эффективности иммунобиологического препарата от даты выпуска до окончания срока годности является изучение его устойчивости, т.е. стабильности. Стабильностью эмульсии называют монодисперсное состояние иммунобиологических препаратов. То есть внешний вид продукта должен быть однородным и без прослоек эмульсии. Для этих целей используют стабилизирующие агенты – эмульгаторы. В производстве эмульгированных вакцин против птичьего гриппа широко применяются следующие адъюванты в качестве эмульгаторов: Montanide ISA 70 VG, 71 VG, 760 VG, 780 VG, GEL01, Stone, IFA, Chitosan, CAvant® WO-60, CAP и альгинат. Выбор адъюванта зависит от экономических соображений и типа эмульсии будущей вакцины [23-25].

Использование в производстве вакцин адъюванта Montanide ISA 70 является широко применяемой в ветеринарной вакцинологии и вакцин для людей. По данным работ I.C. Jossie и его коллег, сравнение опытных серий вакцин с адъювантом Montanide ISA 70 показал лучший иммунный ответ у иммунизированных птиц по сравнению с опытной серией вакцин с минеральным масляным адъювантом [26].

Готовая форма исследуемых образцов вакцины имела вид однородной эмульсии белого цвета. Флакон и фасовка соответствует стандарту организации НИИПББ.

При изучении стабильности эмульсии изготовленных экспериментальных серий инактивированной вакцины против гриппа птиц в течение 12 месячного срока хранения результаты свидетельствуют о хорошей стабильности эмульсии, имелись частичное расслоение эмульсии, которые легко восстанавливались при встряхивании (табл. 1).

В дальнейшем измеряли значения рН вакцин через каждые 3, 6, 9 и 12 месяцев при температуре хранения (2-8)°C. Результаты средних значений физико-химические свойства вакцины (рН, вязкость и стабильность эмульсии) представлены в таблице 1.

Таблица 1

Физические параметры эмульгированной, инактивированной вакцины против гриппа птиц.

Вакцины из рекомбинантных штаммов гриппа птиц	Физико-химические свойства вакцины			р-значение
	рН	Вязкость (мм ² /с)	Стабильность эмульсии	
A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A	7,45 ± 0,00	38,02	стабильна	P<0,0001
A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)-PR8-IDCDC-RG42A	7,46 ± 0,00	38,00	стабильна	P<0,0001
A/Hong Kong/308/2014-A/PR/8/34[R] (6+2) H9N2	7,42 ± 0,00	38,50	стабильна	P<0,0001

Показатель водородных ионов испытываемых вакцин через 3, 6, 9 и 12 месяцев при температуре хранения (2-8)°С сохраняется в пределах нормы (7,2-7,6). Например, у трех экспериментальных серий вакцины из рекомбинантного штамма A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014(H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A значение рН варьирует между 7,38-7,53, вакцины из рекомбинантного штамма A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)-PR8-IDCDC-RG42A - между 7,43-7,54, вакцины из рекомбинантного штамма A/Hong Kong/308/2014-A/PR/8/34[R] (6+2) H9N2 – между 7,43-7,53 (рис. 1).

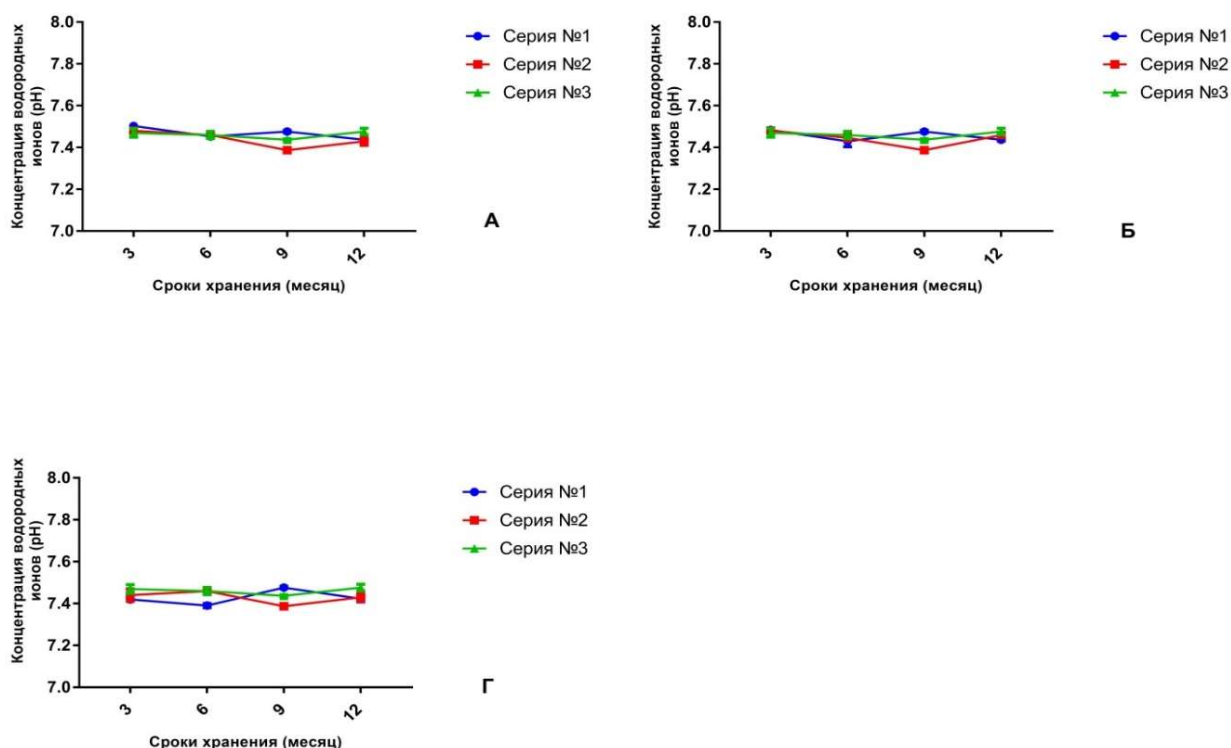


Рис. 1. Результаты оценки рН экспериментальных серий вакцин из актуализированных штаммов гриппа птиц (средние показатели рН).

Данные приведенные на рисунке 1 показывают, что вакцина соответствует всем требованиям НД, и сохраняет высокую стабильность в течение 12 месяцев.

У вакцин, содержащие масляные адъюванты, оценивают кинематическую вязкость эмульсии. Вязкостью понимают свойства жидкости, которое определяет сопротивление жидкости к внешнему воздействию. Вязкость можно представить как внутреннее трение между отдельными слоями видов жидкости при их смещении относительно друг друга. Согласно регламентирующим документам производства иммунобиологических препаратов разных стран, кинематическая

вязкость измеряется с использованием визкозиметра (капиллярного, ротационного, вибрационного, микрофлюидного и бесконтактной реологии) Определение кинематической вязкости производится согласно ГОСТ-17025 используя капиллярный визкозиметр [22]. Метод основан на определении времени истечения через капилляр определенного объема жидкости из измерительного резервуара. Кинематическая вязкость испытуемых вакцин против гриппа птиц при температуре хранения (2-8) °С составила в среднем 37,0 до 38,0 мм²/с, что соответствует требованиям стандарта организации СТ 405-1919-04 ГП-096-2017 (рис. 2).

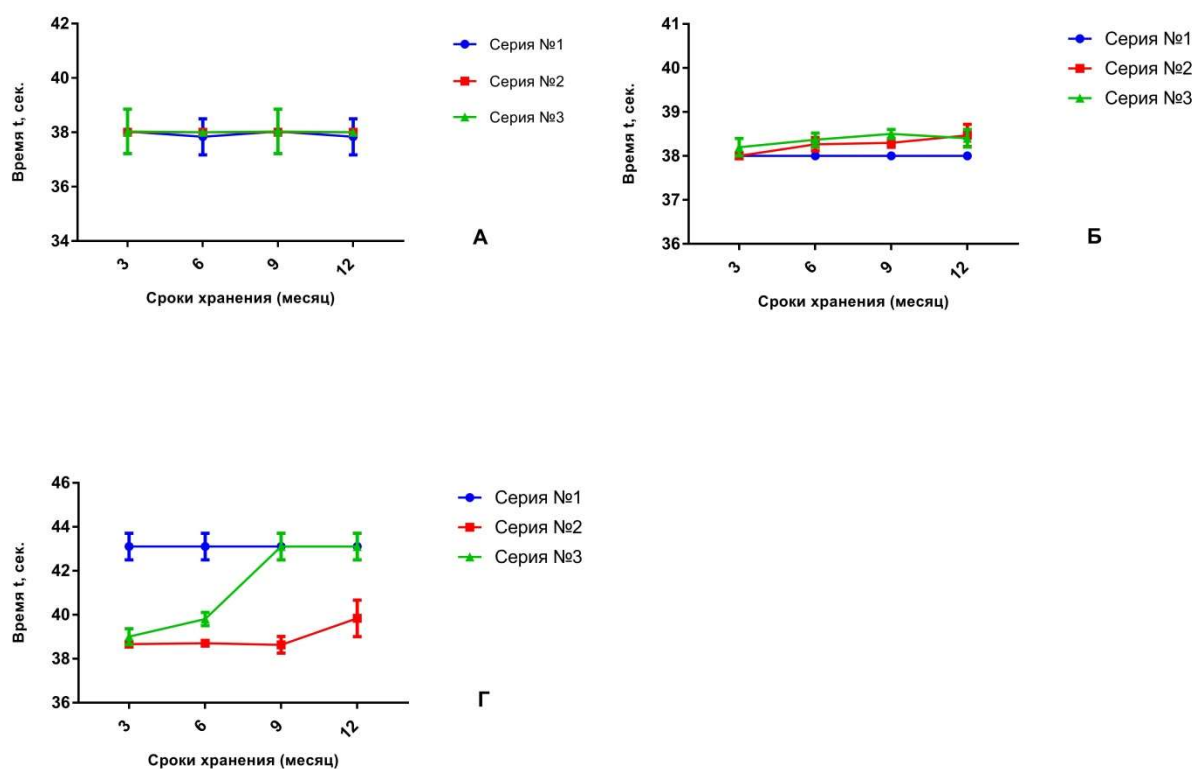


Рис. 2. Результаты оценки кинематической вязкости экспериментальных серии вакцин из актуализированных штаммов гриппа птиц (средние показатели кинематической вязкости экспериментальных серии вакцин против гриппа птиц).

Основным фактором качества иммунобиологических препаратов является его стабильность, т.е. способность сохранять физико-химические свойства и фармакологическую активность, предусмотренные требованиями нормативной документации в течение установленного срока годности. Основным критерием стабильности вакцины служит сохранение его качества, т.е. внешнего вида, стабильности эмульсии, pH, кинематической вязкости, безопасности и специфической активности, и других нормированных пока-

зателей [27]. Также, на стабильность иммунобиологического препарата значительное влияние оказывают условия получения, хранения и транспортировки. В последствии нарушения условий хранения вакцины теряется ее иммунобиологические свойства, как способность вызывать активный специфический иммунитет. Таким образом очень важно соблюдение условий технологического процесса, которое обеспечивает соответствие требованиям спецификации и стабильность конечного продукта. Авторами проведен

сравнительный анализ физико-химических показателей - отечественных вакцин из актуализированных штаммов гриппа птиц (H5N8, H5N6, H5N9), где вышеуказанные качества вакцины были анализированы в соответствии с нормативами стандарта организации, принятыми в биологической промышленности при производстве и контроле инактивированных эмульгированных вакцин. В результате установлено, что показатели физико-химических свойств (концентрации водородных ионов (pH), стабильности эмульсии, кинематической вязкости) изученных опытно-промышленных серий исследуемых вакцин остаются стабильными в течение года и свидетельствует о том, что производственные серии вакцин соответствуют спецификациям по физико-химическим свойствам в течение гарантированного срока хранения.

Литература:

- Mindaugas J., Linas A. Influenza virus. *Medicina*. 2007. №43(12). - С. 919-929.
- Lee C.W., Saif Y.M. Avian influenza virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009. №32. - С. 301-310.
- Wu Y., Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 2014. №22. С.183-191.
- Spackman E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2014. №116. - С. 105-108.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992. №56. С. 152-179.
- Fouchier R.A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Clin Microbiol*. 2000. №38. С. 4096-4101.
- Wang Y., Lupiani B., Reddy S.M., Lamont S.J., Zhou H. RNA-seq analysis revealed novel genes and signaling pathway associated with disease resistance to avian influenza virus infection in chickens. *Poult Sci*. 2014. №93(2). С. 485-93.
- Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. Development of a real-time 630 reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the 631 avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Clin Microbiol*. 2002. №40(9). С. 3256-3260.
- Xie Z., Xie L., Zhou C., Liu J., Pang Y., Deng X., Xie Z., Fan Q. Complete genome sequence analysis of an H6N1 avian influenza virus isolated from Guangxi pochmark ducks. *J*. 2012. №86. P. 13868-13869.
- Webster R., Cox N., Stohr K. WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization, Switzerland. 2010. - 99.
- Xie Z., Guo J., Xie L., Liu J., Pang Y., Deng X., Xie Z., Fan Q., Luo S. Complete genome sequence of a novel reassortant Avian Influenza H1N2 virus isolated from a domestic sparrow in 2012. *Genome Announc*. 2013. № 4. - С. 00431-13.
- Wright S.M., Kawaoka Y., Sharp G.B., Interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs and turkeys in the United States. *Arm J Epidemiol*. 1992. №136. С. 448-97.
- Hiromoto Y., Yamazaki Y., Fukushima T. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *J Gen*. 2000. № 81. С. 1293-1303.
- Sklyarenko S.L. Research on Important Bird Areas in Kazakhstan and Middle Asia. - Almaty, 2016. - 227 с.
- Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., Bean W.J., Murti K.G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. 1978. №84(2). С. 268-276.
- Swayne D.E. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza. *Avian Dis*. 2012. №56. С. 818-28.
- Kydyrbayev Zh.K., Tabynov K.K., Ryskeldynova Sh.Zh., Mamadalyev S.M., Khairullin B.M. Immunogenicity of the inactivated oil emulsion influenza A (H5N1) vaccine in chickens. *Agric Biol J N*. 2010. №3. С. 201-207.
- European Pharmacopoeia, 5th ed. - Strasbourg: Council of Europe, 2004. - 671 p.
- The state pharmacopoeias of the Republic of Kazakhstan. - Almaty: Zhibek zholy, 2008. - 592 p.
- Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бунятин Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). М.: Гриф и К. 2012. С. 536.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. I том. 2.2.3.- Потенциометрическое определение pH. Алматы: Жибек жолы. 2008. С. 41-43.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. I том. 2.2.8. - Вязкость. Алматы: Жибек жолы. 2008. С. 47-51.
- Lone N.A., Spackman E., Kapczynski D. Immunologic evaluation of 10 different adjuvants for use in vaccines for chickens against highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine*. 2017. №35(26). С. 3401-3408.
- Stone H.D., Brugh M., Hopkins S.R., Yoder H.W., Beard C.W. Preparation of inactivated oil-emulsion vaccines with avian viral or Mycoplasma antigens. *Avian Dis*. 1978. №22. - С. 666-74.
- Lee E.S., Shim Y.J., Chathuranga W.A., Ahn Y.H., Yoon I.J., Yoo S.S., Lee J.S. CAVant® WO-60 as an effective immunological adjuvant for avian influenza and Newcastle disease vaccine. *Front Vet Sci*. 2021. №8. С. 700-730.
- Cahyani J.I., Widayanti S., Wibowo M.H. Comparative safety and efficacy of two bivalent vaccines containing Newcastle disease LaSota and avian influenza H9N2 Sidrap isolate formulated with different oil adjuvants. *Vet World*. 2020. №11. С. 2493-2501.
- Сагымбай А.Б., Касенов М.М., Хайруллин Б.М., Волгин Е.Н., Сарсенбаева Г.Ж., Нурпейсова А.С., Богданов Н.В., Исагулов Т.Е., Абитай Р.Т. Изучение стабильности качества отечественной аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа. *Известия НАН РК. Серия Биологии и медицины*. 2017. № 6(324). - С. 170 -175.