

DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-164-170
УДК 619:616:98:578.835.2:615.371



Инактивация вируса ящура для изготовления вакцин

Д. В. Михалишин, В. В. Михалишин, Ы. М. Гочмурадов, Ю. С. Елькина

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Инактивация – это потеря вирусом способности к репродукции и инфицированию восприимчивых животных при сохранении антигенных свойств. В работе показана эффективность применения аминоэтилэтанимина в качестве инактиванта вируса ящура. Определены скорость снижения титра инфекционности при выбранных параметрах процесса инактивации, влияние аминоэтилэтанимина на стабильность вируса в процессе инактивации и на иммуногенность вакцин после хранения при температуре 2–8 °С. Представлен метод вычисления пятидесятипроцентной инактивирующей концентрации аминоэтилэтанимина (K_{50}), позволяющей определять качественную характеристику вирусосодержащей суспензии, сравнивать активность инактиваторов и их способность обеспечивать авирулентность препарата в заданный промежуток времени. В результате проведенных исследований было установлено, что значение K_{50} для неочищенной и очищенной вирусосодержащих суспензий было одинаковым – 0,0045%, а уровень безопасности после 12 ч инактивации составил одну ТЦД₅₀ в 10^9 – 10^{11} л вирусосодержащей суспензии. Также было выявлено, что увеличение времени инактивации в два раза повысило вирулицидную активность аминоэтилэтанимина: для типа О – в 1,8 раза, для типа А – в 2,4 раза. В то же время очистка от клеточного дебриса на процесс инактивации не оказывала существенного влияния. Аминоэтилэтанимин не разрушает 146S частицы вируса, что и было подтверждено при исследовании иммуногенной активности вакцин в процессе хранения. Таким образом, аминоэтилэтанимин, выпускаемый в виде 15%-го водного раствора российской фирмой ООО «Биохимресурс» (г. Владимир), соответствует высоким стандартам качества. При исследовании иммуногенности эмульсионной бивалентной противоящурной вакцины для крупного рогатого скота в остром опыте установили, что активность препарата составила 10,08 защитных доз в прививном объеме 2 см³.

Ключевые слова: вирус ящура, вирулицидная активность, инактиватор, вакцина

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Михалишин Д. В., Михалишин В. В., Гочмурадов Ы. М., Елькина Ю. С. Инактивация вируса ящура для изготовления вакцин. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (2): 164–170. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-164-170.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Михалишин Дмитрий Валерьевич, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Inactivation of foot and mouth disease virus for vaccine production

D. V. Mikhilishin, V. V. Mikhilishin, Y. M. Gochmuradov, Yu. S. El'kina

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Inactivation is the loss by a virus of ability to reproduce and infect susceptible animals while retaining its antigenic properties. In this paper, the effectiveness of aminoethylethanolamine when used as an FMDV inactivant is shown. The inactivation rates under selected parameters, effect of aminoethylethanolamine on virus stability during inactivation and on vaccine immunogenicity after storage at 2–8 °C were determined. The method for calculation of 50% aminoethylethanolamine inactivating concentration (IC_{50}) which enables to determine quality parameters of the virus-containing suspension, to compare the inactivating agent activities and their ability to ensure the vaccine innocuity within the given period of time is presented. It was established that IC_{50} for purified and non-purified virus-containing suspensions was identical (0.0045%), and its safety after 12 h of inactivation was one TCID₅₀ per 10^9 – 10^{11} L of the virus containing suspension. It was also found that double increase in inactivation time increased the virucidal activity of aminoethylethanolamine by a factor of 1.8 for serotype O and 2.4 for serotype A. At the same time, the removal of cell debris had no significant effect on the inactivation process. Aminoethylethanolamine does not destroy 146S virus particles and it was confirmed by immunogenicity testing of the vaccines during storage. This means that 15% aqueous solution of aminoethylethanolamine, manufactured by Russian Company ООО "BIOKHMRESURS" (Vladimir) complies with high quality standards. Immunogenicity test of bivalent FMD vaccine for cattle by challenging demonstrated that its potency was 10.08 protective doses per 2 cm³ of the vaccination dose.

Keywords: foot and mouth disease virus, virucidal activity, inactivating agent, vaccine

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Mikhilishin D. V., Mikhilishin V. V., Gochmuradov Y. M., El'kina Yu. S. Inactivation of foot and mouth disease virus for vaccine production. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (2): 164–170. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-164-170.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

© Михалишин Д. В., Михалишин В. В., Гочмурадов Ы. М., Елькина Ю. С., 2023

For correspondence: Dmitry V. Mikhailishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Изготовление цельновирионных вакцин против ящура представляет собой сложный и многоэтапный процесс. Одним из обязательных этапов в технологии производства вакцин является инаktivация вируса ящура. Инаktivация – это потеря вирусом способности к репродукции и инфицированию восприимчивых животных при сохранении антигенных свойств [1].

Основное требование к инаktivанту состоит в том, чтобы он, изменяя нуклеиновую кислоту вируса, существенно не нарушал свойства белка – носителя иммуногенности. При изготовлении противоящурных вакцин формальдегид был первым химическим агентом, использованным для инаktivации вируса [2], с его помощью получили авирулентный, пригодный для иммунизации крупного рогатого скота препарат.

Формальдегид как инаktivант имеет ряд недостатков: узкие границы концентраций, инаktivующих инфекционность вируса и снижающих иммуногенность вакцины; многокомпонентный характер кривой снижения инфекционности [3–5], который не позволяет определить конечную точку инаktivации для расчета уровня безопасности вакцины [6]; продукты реакции формальдегида с балластными белками обладают аллергической активностью [7]; вакцины плохо сохраняются при повышенной температуре. В качестве инаktivантов были испытаны гидроксиламин, метилглиоксаль, окись этилена, однако они не нашли широкого применения при изготовлении противоящурных вакцин.

Исследования F. Brown et al. [8, 9] открыли новый класс химических веществ (азиридины), которые превосходили формальдегид в скорости инаktivации и сохранении иммуногенных свойств вируса ящура.

Bahnemann H. G. [10, 11] предложил использовать для инаktivации вируса ящура реакционную смесь, полученную в результате синтеза этиленимина из 2-бромэтиламина гидробромида. Этот препарат был назван бинарным этиленимином, который широко используется в технологии изготовления противоящурных вакцин.

Азиридины инаktivируют инфекционность вируса по реакции первого порядка без существенного снижения иммуногенности. Линейное снижение инфекционности дает возможность рассчитать уровень специфической безопасности вакцины [12–16].

Скорость взаимодействия инаktivанта с активными группами белковой оболочки и нуклеиновой кислотой вирусов прямо пропорциональна концентрации реагирующих групп. Кроме концентрации инаktivанта на скорость инаktivации оказывают влияние температура, время инкубации, pH среды и компоненты вирусосодержащей суспензии. При изготовлении вакцины особое значение имеет не скорость инаktivации основной массы вирусной популяции, а способность химического вещества обеспечивать полную инаktivацию вируса [17].

При производстве противоящурной вакцины важным требованием к обеспечению безопасности продукта является полнота инаktivации вируса ящура. Безопасность вакцины может контролироваться более эффективно с помощью изучения кинетики инаktivации, которая позволяет определить теоретическое время инаktivации, а также порядок дезактивации вируса. Логарифмический график остаточной инфекционности в зависимости от времени реакции инаktivации должен быть линейным. Полученная таким образом прямая линия позволяет провести экстраполяцию до конечной точки периода инаktivации. Проверка процесса инаktivации является неотъемлемой частью гарантии качества вакцины [18, 19]. Аминоэтилэтилен-имин (АЭЭИ) в исследованиях Н. А. Улупова и соавт. был определен наиболее подходящим инаktivантом, который используется в процессе изготовления противоящурных вакцин в настоящее время [20].

Преимущества и перспективность использования АЭЭИ в производстве вакцин против ящура отмечали в своих работах многие авторы [21–24]. Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует для инаktivации инфекционности вируса ящура в производстве вакцин применять бинарный этиленимин [25]. Механизм инаktivации вируса этиленимином и его олигомерами заключается в алкилировании нуклеиновой кислоты или белка с разрывом этиленового цикла [6, 20].

В данной статье приведены некоторые результаты исследований по инаktivации инфекционной активности вируса ящура АЭЭИ. Показан метод оценки вирулицидности инаktivанта и его влияние на иммуногенность вакцин и стабильность антигена в процессе хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали производственные штаммы вируса ящура типов А, О, С, Азия-1, CAT-1, CAT-2, CAT-3, адаптированные к новорожденным крольчатам и суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17.

Животные: белые мыши массой 18–20 г, мышата-сосуны 3–5-суточного возраста, крупный рогатый скот (КРС) массой 250–300 кг.

Культура клеток: первично трипсинизированная культура свиной почки (СП), суспензионная культура клеток ВНК-21/2-17.

Инаktivант: 15%-й водный раствор 1-(2-аминоэтил)-азиридина (ООО «Биохимресурс», Россия) и безводный АЭЭИ при хранении над сухой щелочью (NaOH).

Определение величины K_{50} инаktivантов. Определение вирулицидной активности АЭЭИ основано на установлении концентрации инаktivанта, обеспечивающей снижение инфекционности вирусосодержащей суспензии до 10^0 ЛД₅₀ или ТЦД₅₀ при заданных параметрах времени, температуры и pH. По аналогии

с методом определения иммуногенности вакцин путем вычисления 50%-й защитной дозы можно рассчитать концентрацию инактиванта, защищающую от поражения вирусом 50% зараженных животных или флаконов с культурой ткани (K_{50}).

Величину K_{50} определяли по формуле Кербера – Ашмарина:

$$\lg K_{50} = \lg D_{\max} - \lg d (\Sigma L_i - 0,5),$$

где $D_{\max}$ – максимальная концентрация инактиванта, при которой не заболевают ящуром все зараженные тест-объекты;

d – кратность испытываемых концентраций инактиванта;

ΣL_i – сумма отношений количества незаболевших мышат-сосунков или не имеющих ЦПД (цитопатическое действие) флаконов с монослоем клеток свиной почки к количеству зараженных мышат-сосунков или флаконов.

Результатом определения K_{50} является процентная концентрация инактиванта в суспензии вируса ящура, снижающая его инфекционность до одной ЛД₅₀ или ТЦД₅₀ в испытываемом объеме суспензии.

Пример:

В точно отмеренные объемы испытываемого вирус-содержащего препарата вносят инактиванта, получая двукратно возрастающие конечные концентрации. В образцах устанавливают одинаковые значения pH и температуры. После заданного периода инкубации определяют остаточную инфекционность препаратов, используя мышат-сосунков или культуру клеток. На каждую концентрацию инактиванта берут по 10 животных или флаконов. Наблюдение за мышатами проводят в течение 7 дней, а за культурой клеток от 3 до 4 дней, регистрируя количество пораженных и непораженных объектов.

Концентрация инактиванта	Количество животных в опыте	Количество незаболевших	Отношение количества незаболевших к числу зараженных
0,005	10	0	0/10
0,010	10	3	3/10
0,020	10	7	7/10
0,040	10	10	10/10
0,080	10	10	10/10

Расчет K_{50} по данным таблицы: $\lg K_{50} = \lg 0,08 - \lg 2 (0/10 + 3/10 + 7/10 + 10/10 + 10/10 - 0,5) = 2,9 - 0,3 \times 2,5 = 2,9 - 0,75 = 2,15$.

Антилогарифм 2,15 равен 0,014, следовательно, $K_{50} = 0,014\%$.

Вычисленная концентрация инактиванта в вирусном препарате, равная 0,014%, обеспечивает снижение инфекционности до уровня одной инфекционной единицы в течение заданного времени, температуры и pH инактивации. Достоинство метода в быстром определении режима инактивации вируса для производства вакцины. Рассчитанная концентрация инактиванта, защищающая 50% тест-объектов, отражает качественную характеристику любого компонента вирусосодержащей суспензии, роль температуры, pH при режиме инактивации АЭЭИ и его вирулицидную активность при замене партии (серии) и в процессе хранения [17].

Определение динамики инактивации инфекционности вируса ящура. Динамику инактивации инфекционности определяли после вычисления величины K_{50} . В вирусную суспензию вносили инактиванта до концентрации, в несколько раз превышающей K_{50} , инкубировали смесь при заданной температуре, отбирали пробы суспензии через каждый час и хранили в замороженном виде до испытания на инфекционность. Построенный график снижения титра инфекционности характеризовал скорость инактивации и уровень специфической безопасности вакцины для определенной длительности инактивации.

Экспериментальные вакцины из лапинизированного вируса ящура готовили на ацетатном, аммиачном и фосфатном буферных растворах. Вирусные суспензии, содержащие 10% кроличьей ткани, очищали хлороформом, добавляли раствор АЭЭИ до концентрации 0,03%, устанавливали pH в пределах 7,2–7,8 и инкубировали при температуре 26–27 °C в течение 24 ч. Из авирулентных суспензий готовили вакцины, содержащие 59,5% суспензии, 30% гидроокиси алюминия с 3%-й концентрацией Al_2O_3 , 10% глицерина и 0,5% раствора сапонина 10%-й концентрации.

Из инактивированной суспензии культурального вируса ящура типов А и О на адьюванте Montanide™ ISA 206 в соотношении 1:1 приготавливали бивалентную эмульсионную вакцину с содержанием по 4 мкг 146+75S компонента каждого типа в прививной дозе.

Контроль иммуногенности вакцин проводили на взрослых белых мышах, которых вакцинировали подкожно по 0,4 см³ цельной вакциной и разведенной в 2, 4, 8, 16 раз фосфатным буфером. Через 21 день мышей заражали адаптированным к ним гомологичным вирусом в дозе 10⁴ ЛД₅₀/см³. После 8-дневного наблюдения определяли 50%-ю иммунизирующую дозу вакцины (ИмД₅₀) по формуле Кербера – Ашмарина.

Бивалентная эмульсионная вакцина со сложным типом эмульсии «вода – масло – вода» была испытана количественным методом на КРС. Вакцину вводили трем группам животных по пять голов в каждой внутримышечно снижающейся дозой с 4-кратным шагом (2,0; 0,5 и 0,12 см³). Контрольное заражение осуществляли на 28-е сут после иммунизации путем введения 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³ гомологичного вируса в слизистую языка. Через 7 сут проводили осмотр животных и устанавливали протективную дозу (ПД₅₀) в прививном объеме для каждого типа вируса, входящего в состав вакцины.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по определению концентраций АЭЭИ в вирусной суспензии, обеспечивающих снижение вирулентности проб до одной ЛД₅₀, при контроле на мышатах-сосунках 3–5-суточного возраста приведены в таблице 1.

Как видим, 0,0025%-я концентрация АЭЭИ в суспензиях на ацетатном и аммиачном буферных растворах

и 0,0031%-я концентрация АЭЭИ в суспензии на фосфатном буферном растворе снижали инфекционность до одной ЛД₅₀ в течение 24 ч инкубации при 26 °С.

Принимая во внимание данные литературы о том, что азиридины инактивируют инфекционность вируса ящура по реакции первого порядка и скорость инаktivации пропорциональна концентрации инактиванта, были определены графики снижения инфекционности вируса типа О в фосфатном буфере при 26–27 °С для концентраций АЭЭИ 0,01 и 0,02%. Эти концентрации в 3,22 и 6,45 раза превосходили величину К₅₀, что должно было ускорить инаktivацию в соответствующее количество раз. Однако средняя скорость инаktivации через 3 и 6 ч инкубации была в 4 и 8 раз выше, чем при использовании концентрации 0,0031 ± 0,00031%.

Средние значения, полученные в результате проведения трех опытов по изучению кинетики инаktivации инфекционности вируса ящура типов А, О, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3 с использованием фосфатно-буферного раствора, АЭЭИ в концентрации 0,03% и при температуре 26–27 °С и pH 7,2–7,8, показали, что, несмотря на различия в титрах инфекционности перед началом инаktivации, у всех 7 серотипов инфекционность была утрачена через 2 ч. Для режима инаktivации длительностью 8 ч уровень специфической безопасности соответствовал одной ЛД₅₀ в 0,1 л (3 ч) и в 10⁹ л (6 ч). Экстраполяция кривых инаktivации на длительность в 8 ч свидетельствовала о том, что уровень специфической безопасности суспензии соответствовал одной ЛД₅₀ в 10^{15,3}–10^{15,8} л для серотипов А, О, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3. Средняя скорость инаktivации вируса ящура по 7 серотипам составила 10^{3,4} ЛД₅₀ в час.

Поскольку димер этиленмина обладает токсичностью, его применяют в виде водных растворов (например, 15%-й водный раствор АЭЭИ), при этом стабильность действующего вещества в растворе снижается в процессе хранения. Поэтому следующим этапом было исследование вирулицидной активности 15%-го раствора АЭЭИ в процессе хранения при температуре 2–8 °С в течение 0, 2, 4, 6 мес. по отношению к культуральному вирусу ящура типа О. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как видим, вирулицидная активность инактиванта не снизилась после хранения в течение 6 мес. при температуре 2–8 °С, так как 50%-я инаktivирующая концентрация (К₅₀) существенно не изменилась через 2, 4, 6 мес. по сравнению с концентрацией до хранения.

Также установили, что 15- и 1-процентный растворы АЭЭИ в деминерализованной воде сохраняли активность в течение 6 мес. (срок наблюдения) при температуре 2–8 °С. Безводный АЭЭИ при хранении над сухой щелочью (NaOH) сохранял активность в течение 20 лет (срок наблюдения) при температуре хранения минус 10–20 °С (неопубликованные данные).

Влияние АЭЭИ на иммуногенность лапинизированного вируса ящура в составе вакцины, содержащей гидроокись алюминия, глицерин и сапонин, исследовали на серотипе О как наиболее лабильном.

В образцы суспензии лапинизированного вируса после очистки хлороформом добавляли раствор АЭЭИ до концентрации 0,03%. Через 24 ч инаktivации вируса при 26–27 °С и pH 7,2–7,8 определяли авирулентность и готовили вакцины. Для оценки иммуногенности препаратов использовали метод количественного определения ИмД₅₀ на белых мышах массой 18–20 г. Животных

Таблица 1

Влияние среды суспендирования лапинизированного вируса ящура типа О на вирулицидную активность АЭЭИ (n = 7)

Table 1

Effect of medium used for lapinized FMDV type O suspension on AEEA virucidal activity (n = 7)

Ацетатный буферный раствор	Аммиачный буферный раствор	Фосфатный буферный раствор
Величина К ₅₀ при инаktivации вируса в течение 24 ч при 26–27 °С и pH 7,2–7,8		
0,0025 ± 0,00029 P < 0,005	0,0025 ± 0,00029 P < 0,005	0,0031 ± 0,00031 P < 0,001

Таблица 2

Влияние времени хранения на вирулицидную активность АЭЭИ

Table 2

Effect of storage time on AEEA virucidal activity

Время хранения инактиванта (мес.)	К ₅₀ (%)
0	0,0036 0,0040 0,0047
M ± m	0,0041 ± 0,0003
2	0,0050 0,0047 0,0043
M ± m	0,0047 ± 0,0002
4	0,0029 0,0038 0,0047
M ± m	0,0038 ± 0,0005
6	0,0050 0,0040 0,0052
M ± m	0,0047 ± 0,0005

иммунизировали подкожно разведениями вакцины в 1/15 М фосфатном буферном растворе и заражали через 21 день после вакцинации. Иммуногенную активность вакцин определяли после изготовления, через год и 8 лет хранения при температуре 2–8 °С. Результаты опытов представлены в таблице 3.

Установили, что оптимальная по уровню безопасности концентрация АЭЭИ позволила получить одинаковые по иммуногенности вакцины, которые не снижали активности после 8 лет хранения. Однако это коснулось тех вакцин, в которых вирус был суспендирован в ацетатном буферном растворе. Тенденцию к снижению активности выявили у вакцин из вируса, суспендированного в аммиачном и фосфатном буферных растворах.

В процессе работы по инаktivации инфекционности вируса ящура был использован инактивант, полученный двумя способами синтеза: первый – при полимеризации этиленмина получали безводный АЭЭИ, а при циклизации сульфозэфира аминоэтилэтиленмина – водный раствор АЭЭИ, содержащий пиперазин. Второй способ используется по настоящее время при изготовлении противоящурных вакцин из вируса, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17.

На следующем этапе изучали кинетику снижения инфекционности культурального вируса ящура

Таблица 3

Зависимость стабильности иммуногенных компонентов вируса ящура типа О от среды суспендирования и времени хранения

Table 3

Dependence of FMDV type O immunogenic component stability on suspension medium and storage time

№ п/п	Среда суспендирования вируса	Концентрация АЭЭИ в суспензии (%)	Иммуногенность вакцин для мышей (ИмД ₅₀ в 1 см ³)		
			после изготовления	через 1 год хранения	через 8 лет хранения
1	Ацетатный буферный раствор	0,03	0,16	0,15	0,18
			0,17	0,19	0,21
			0,16	0,18	0,16
			0,15	0,15	0,17
			$M \pm m$	$0,16 \pm 0,008$	$0,18 \pm 0,022$
2	Аммиачный буферный раствор	0,03	0,19	0,29	0,30
			0,19	0,19	0,25
			0,10	0,23	0,24
			0,11	0,11	0,14
			$M \pm m$	$0,15 \pm 0,049$	$0,23 \pm 0,067$
3	Фосфатный буферный раствор	0,03	0,12	0,16	0,21
			0,13	0,18	0,19
			0,13	0,21	0,20
			0,14	0,20	0,23
			$M \pm m$	$0,13 \pm 0,008$	$0,21 \pm 0,017$

Таблица 4

Влияние времени инактивации на вирулицидную активность АЭЭИ

Table 4

Effect of inactivation time on AEEA virucidal activity

Время инактивации (ч)	K ₅₀ (%)	
	вирус ящура типа О	вирус ящура типа А
12	0,0027	0,0031
	0,0030	0,0030
	0,0025	0,0025
	$M \pm m$	$0,0027 \pm 0,0001$
24	0,0015	0,0014
	0,0008	0,0009
	0,0011	0,0012
	$M \pm m$	$0,0011 \pm 0,0001$

Таблица 5

Влияние очистки на инактивацию вируса ящура типа О

Table 5

Effect of purification on FMDV type O inactivation

Количество опытов	K ₅₀ (%)	
	очищенная суспензия	неочищенная суспензия
1	0,0050	0,0048
2	0,0036	0,0040
3	0,0043	0,0040
4	0,0051	0,0052
$M \pm m$	$0,0045 \pm 0,0007$	$0,0045 \pm 0,0006$

серотипа О, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17, в производственном реакторе емкостью 2000 л при концентрации 0,02% АЭЭИ и температуре 37 °С. Выявили, что скорость инактивации существенно ниже скорости инактивации

лапинизированного вируса, несмотря на то что температура инактивации культурального вируса была выше на 10 °С. Это можно объяснить тем, что скорость инактивации инфекционности вируса ящура снижается с увеличением концентрации солей в суспензии и повышением pH. В наших опытах снижение скорости инактивации обусловлено присутствием в суспензии всей массы клеток ВНК-21 в целом и разрушенном виде и более высокой концентрацией солей и других органических веществ. Однако уровень специфической безопасности суспензии после 12 ч инактивации составлял одну ТЦД₅₀ в 10⁹–10¹¹ л суспензии.

Принимая во внимание тот факт, что повышение температуры вирусосодержащей суспензии способствует увеличению вирулицидной активности АЭЭИ, процесс инактивации начинали сразу после окончания репродукции вируса в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 при 37 °С. Влияние времени инактивации при 37 °С на вирулицидную активность инактиванта исследовали через 12 и 24 ч.

Результаты, представленные в таблице 4, свидетельствуют о том, что с увеличением времени инкубации при постоянной температуре вирулицидное действие АЭЭИ возрастало для типа О – в 1,8 раза, для типа А – в 2,4 раза.

Так как в процессе инактивации образуется мелко-дисперсная взвесь, технологически удобнее проводить инактивацию до очистки вирусосодержащей суспензии. Поэтому следовало доказать, что такой режим инактивации достаточен для получения авирулентной суспензии как очищенного, так и неочищенного культурального вируса ящура (табл. 5).

Установили, что величина K₅₀ для неочищенной и очищенной суспензий была одинаковой и составляла 0,0045%. Этот факт подтвердил, что клеточный дебрис, содержащийся в неочищенной суспензии, не оказывал отрицательного воздействия на процесс инактивации.

Определение компонентного состава культурального вируса ящура серотипов А, О, С и Азия-1 иммунохимическим методом до и после инактивации инфекционности показало, что не происходило разрушения 146S компонента вируса.

С использованием разработанного режима инактивации культурального вируса ящура типов О и А приготовили бивалентную эмульсионную вакцину, которую испытали на иммуногенную активность количественным методом на КРС (табл. 6).

Данные таблицы 6 показали, что активность вакцины по обоим типам равнялась 10,08 ПД₅₀ в прививном объеме 2 см³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере вируса ящура, адаптированного к организму крольчат 2–3-суточного возраста и к суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17, показана вирулицидная активность олигомера этиленимина – N-аминоэтилэтиленимина (димера этиленимина, АЭЭИ). Начальным этапом оценки инактиванта было определение концентрации, обеспечивающей получение авирулентной вирусной суспензии при заданных параметрах процесса инактивации (температура, концентрация вируса, длительность, pH), и расчет K₅₀. Величина K₅₀ для неочищенной и очищенной суспензий была одинаковой и составляла 0,0045%. Этот факт

подтвердил, что клеточный дебрис и лапинизированные балластные белки, содержащиеся в неочищенной суспензии, не оказывали отрицательного воздействия на процесс инактивации.

Построенный график снижения титра инфекционности при выбранных параметрах процесса инактивации (0,02%-я концентрация АЭЭИ при температуре 37 °C) позволил определить уровень безопасности после 12 ч инактивации, который составил одну ТЦД₅₀ в 10⁹–10¹¹ л вирусосодержащей суспензии, предназначенной для получения вакцины.

В результате изучения зависимости концентрации АЭЭИ и времени хранения вакцины на иммуногенность вируса ящура было установлено, что после инактивации не происходило разрушения 146S компонента вируса.

Иммуногенная активность бивалентной противоящурной вакцины по типам А и О равнялась 10,08 ПД₅₀ в прививном объеме 2 см³. Вирулицидность, стабильность, высокая скорость снижения инфекционности, минимальное повреждение 146S частиц основного иммуногенного компонента вируса указывает на то, что АЭЭИ в качестве инактиванта вируса ящура имеет ряд преимуществ перед другими азиридидами. Таким образом, аминоэтилэтиленмин, выпускаемый в виде 15%-го водного раствора российской фирмой ООО «Биохимресурс» (г. Владимир), соответствует высоким стандартам качества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика; 2007. 524 с.
- Vallée H., Carré H., Rinjard P. Sur l'immunisation anti-aphteuse par le virus formolé. *Rev. gén. Méd. vét.* 1926; 35: 129–134.
- Barteling S. J., Woortmeyer R. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccine. *Arch. Virol.* 1984; 80 (2–3): 103–117. DOI: 10.1007/BF01310652.
- Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1960; 83: 638–648. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x.
- Melvin P. A., Pryce J.-M. G. Production of viral antigens with N-acetyl-ethyleneimine. Patent No. US3318775A United States, Int. C12N7/00. Imperial Chemical Industries Ltd. Date of filing: 29.01.1963. Date of publication: 09.05.1967. Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/US3318775A/en>.
- Улулов Н. А., Михалишин В. В., Гусев А. А., Лёзова Т. Н. Аминоэтилэтиленмин – средство инактивации инфекционности вируса ящура. *Современные аспекты ветеринарной патологии животных: материалы конференции, посвященной 40-летию со дня основания ВНИИЗЖ (23–25 ноября 1998 г.)*. Владимир; 1998; 53–62.
- Pay T. W. F., Telling R. C., Kitchener B. L., Southern J. Some observations of FMD virus inactivation with acetyleneimine. In: *European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee (22–24 October 1971, Tübingen, Germany)*. Rome: FAO; 1972; 81–86. Режим доступа: <https://www.fao.org/3/ca9381en/ca9381en.pdf>.
- Brown F., Crick J. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* 1959; 82 (5): 444–447. PMID: 13641679.
- Brown F., Hyslop N. St G., Crick J., Morrow A. W. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (Lond)*. 1963; 61 (3): 337–344. DOI: 10.1017/s0022172400039620.
- Bahnemann H. G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine*. 1990; 8 (4): 299–303. DOI: 10.1016/0264-410x(90)90083-x.
- Bahnemann H. G. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 1975; 47 (1): 47–56. DOI: 10.1007/BF01315592.
- Михалишин Д. В. Разработка технологии изготовления эмульсионной вакцины против ящура сельскохозяйственных животных: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Владимир; 2021. 39 с.
- Улулов Н. А. Влияние буферного раствора на инактивацию вируса ящура формальдегидом. *Ветеринария*. 1974; 9: 38–39.

Таблица 6

Иммуногенная активность бивалентной эмульсионной противоящурной вакцины для КРС

Table 6

Immunogenicity of bivalent emulsion FMD vaccine for cattle

Характеристика вакцины	Прививная доза (см ³)	Наличие генерализации		ПД ₅₀	
		A	O	A	O
Эмульсионная на основе адьюванта Montanide™ ISA 206; Антиген: по типу O – 4 мкг, по типу A – 4 мкг	2,0	–	–	10,08	10,08
		–	–		
		–	–		
		–	–		
	0,5	–	–		
		–	–		
		–	–		
		–	+		
	0,12	+	–		
		+	+		
		+	+		
		+	+		
+		+			
Контроль		+	+		

«–» отсутствие генерализации (no podal generalization);

«+» наличие генерализации (podal generalization).

14. Улулов Н. А., Дудников А. И. Изучение активности химических препаратов при инактивации вируса ящура. *Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции ВНИИЖ*. Владимир; 1983; 34–35.

15. Улулова Т. Н., Улулов Н. А., Рыбаков С. С., Коропов В. Н., Дудников А. И. Сравнительное изучение инактивирующей активности азиридинов по отношению к вирусу ящура. *Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции ВНИИЖ*. Владимир; 1983; 37–39.

16. Warrington R. E., Cunliffe H. R., Bachrach H. L. Derivatives of aziridine as inactivants for foot-and-mouth disease virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34 (8): 1087–1091. PMID: 4356910.

17. Улулов Н. А. Методика оценки инактивирующих свойств химических препаратов. Владимир; 1980. 4 с.

18. Barteling S. J. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev. Sci. Tech.* 2002; 21 (3): 577–588. DOI: 10.20506/rst.21.3.1361.

19. Aarthi D., Ananda Rao K., Robinson R., Srinivasan V. A. Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals*. 2004; 32 (3): 153–156. DOI: 10.1016/j.biologics.2004.09.001.

20. Улулов Н. А., Дудников А. И., Михалишин В. В. Лапинизированная противоящурная вакцина ФГУ «ВНИИЗЖ». *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2008; 6: 323–340. eLIBRARY ID: 14933111.

21. Елькина Ю. С. Противоящурные вакцины типов О, Азия-1, А для формирования раннего иммунитета у животных: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2021. 21 с.

22. Еремец В. И., Большакова М. В., Фомина Г. А. и др. Изыскание эффективных инактиваторов при крупномасштабном производстве противоящурных вакцин. *Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института (8–9 июня 2000 г.)*. Щелково; 2000; 52–54.

23. Поголева И. В., Шарыпов А. С., Шабалина Т. Н., Загладова С. В., Китова М. В., Антонов С. А. и др. Испытания эмульсионных вакцин на основе белых масел, полученных гидрокаталитической переработкой нефтяного сырья. *Ветеринария сегодня*. 2017; (4): 42–48.

24. Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Лёзова Т. Н., Михалишин В. В., Константинов А. В., Стариков В. А., Борисов А. В. Эффективность сорбированной вакцины против гетерологичных штаммов вируса ящура типа А. *Ветеринария*. 2016; 2: 16–19. eLIBRARY ID: 25522294.

25. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *WOAH. Terrestrial Animal Health Code*. 2022; Chapter 3.1.8. Режим доступа: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.

REFERENCES

1. Sergeev V. A., Nepoklonov E. A., Aliper T. I. Viruses and viral vaccines. Moscow: Biblioteka; 2007. 524 p. (in Russ.)
2. Vallée H., Carré H., Rinjard P. Sur l'immunisation anti-aphteuse par le virus formolé. *Rev. gén. Méd. vét.* 1926; 35: 129–134. (in French)
3. Barteling S. J., Woortmeyer R. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccine. *Arch. Virol.* 1984; 80 (2–3): 103–117. DOI: 10.1007/BF01310652.
4. Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1960; 83: 638–648. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x.
5. Melvin P. A., Pryce J.-M. G. Production of viral antigens with N-ace-tyl-ethyleneimine. Patent No. US3318775A United States, Int. C12N7/00. Imperial Chemical Industries Ltd. Date of filing: 29.01.1963. Date of publication: 09.05.1967. Available at: <https://patents.google.com/patent/US3318775A/en>.
6. Ulupov N. A., Mikhailishin V. V., Gusev A. A., Lyozova T. N. Aminoethyl-etenimin – sredstvo inaktivatsii infektsionnosti virusa yashchura = Aminoethylethanolamine is an inactivating agent of foot and mouth disease virus infectivity. *Sovremennye aspekty veterinarnoi patologii zhivotnykh: materialy konferentsii, posvyashchennoi 40-letiyu so dnya osnovaniya VNIIZh (23–25 noyabrya 1998 g.) = Modern aspects of animal pathology: proceedings of the conference, devoted to 40th anniversary of ARRIAH (November 23–25, 1998).* Vladimir; 1998; 53–62. (in Russ.)
7. Pay T. W. F., Telling R. C., Kitchener B. L., Southern J. Some observations of FMD virus inactivation with acetyleneimine. In: *European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee.* Rome: FAO; 1972; 81–86. Available at: <https://www.fao.org/3/ca9381en/ca9381en.pdf>.
8. Brown F., Crick J. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* 1959; 82 (5): 444–447. PMID: 13641679.
9. Brown F., Hyslop N. St G., Crick J., Morrow A. W. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. (Lond).* 1963; 61 (3): 337–344. DOI: 10.1017/s0022172400039620.
10. Bahnmann H. G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine.* 1990; 8 (4): 299–303. DOI: 10.1016/0264-410x(90)90083-x.
11. Bahnmann H. G. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 1975; 47 (1): 47–56. DOI: 10.1007/BF01315592.
12. Mikhailishin D. V. Development of technology for manufacture of FMD emulsion vaccine: Author's Abstract of Thesis for degree of Doctor of Science (Veterinary Medicine). Vladimir; 2021. 39 p. (in Russ.)
13. Ulupov N. A. Vliyaniye bufernogo rastvora na inaktivatsiyu virusa yashchura formal'degidom = Effect of buffer solution on foot and mouth disease virus inactivation with formaldehyde. *Veterinariya.* 1974; 9: 38–39. (in Russ.)
14. Ulupov N. A., Dudnikov A. I. Izucheniye aktivnosti khimicheskikh preparatov pri inaktivatsii virusa yashchura = Study of chemical activity for foot and mouth disease virus inactivation. *Aktual'nye problemy veterinarnoi virusologii: tezisy dokladov nauchnoi konferentsii VNIYal = Topical issues of veterinary virology: conference paper abstracts of All-Russian FMD Research Institute scientific conference.* Vladimir; 1983; 34–35. (in Russ.)
15. Ulupova T. N., Ulupov N. A., Rybakov S. S., Koropov V. N., Dudnikov A. I. Sravnitel'noye izucheniye inaktiviruyushchei aktivnosti aziridinov po otnosheniyu k virusu yashchura = Comparative study of aziridine inactivating activities in relation to foot and mouth disease virus. *Aktual'nye problemy veterinarnoi virusologii: tezisy dokladov nauchnoi konferentsii VNIYal = Topical issues of veterinary virology: conference paper abstracts of All-Russian FMD Research Institute scientific conference.* Vladimir; 1983; 37–39. (in Russ.)
16. Warrington R. E., Cunliffe H. R., Bachrach H. L. Derivatives of aziridine as inactivants for foot-and-mouth disease virus vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34 (8): 1087–1091. PMID: 4356910.
17. Ulupov N. A. Evaluation technique of chemical inactivation properties. Vladimir; 1980. 4 p. (in Russ.)
18. Barteling S. J. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev. Sci. Tech.* 2002; 21 (3): 577–588. DOI: 10.20506/rst.21.3.1361.
19. Aarthi D., Ananda Rao K., Robinson R., Srinivasan V. A. Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals.* 2004; 32 (3): 153–156. DOI: 10.1016/j.biologics.2004.09.001.
20. Ulupov N. A., Dudnikov A. I., Mikhailishin V. V. Lapinized foot-and-mouth disease vaccine of the FGI "ARRIAH" origin. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health.* 2008; 6: 323–340. eLIBRARY ID: 14933111. (in Russ.)
21. El'kina Yu. S. Vaccines against foot and mouth disease types O, Asia-1, A to induce early immunity in animals: Author's Abstract of Thesis for degree of Candidate of Science (Veterinary Medicine). Vladimir; 2021. 21 p. (in Russ.)
22. Eremets V. I., Bol'shakova M. V., Fomina G. A., et al. Izyskanie effektivnykh inaktivantov pri krupnomasshtabnom proizvodstve protivoyashchurnykh vaktsin = Search for effective inactivating agents in large-scale production of foot and mouth disease vaccines. *Nauchnye osnovy proizvodstva veterinarnykh biologicheskikh preparatov: tezisy dokladov Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 30-letiyu instituta (8–9 iyunya 2000 g.) = Scientific basis for production of veterinary biological products: conference paper abstracts of All-Russian Scientific and Practical Conference devoted to 30th Anniversary of the Institute (June 8–9, 2000).* Shchelkovo; 2000; 52–54. (in Russ.)
23. Pigoleva I. V., Sharypov A. S., Shabalina T. N., Zaglyadova S. V., Kitova M. V., Antonov S. A., et al. Testing of emulsion vaccines based on white oils obtained as a result of hydrocatalytic processing of oilstock. *Veterinary Science Today.* 2017; (4): 42–48. (in Russ.)
24. Lozovoy D. A., Mikhailishin D. V., Lyozova T. N., Mikhailishin V. V., Konstantinov A. V., Starikov V. A., Borisov A. V. Laboratory studying efficacy of sorbate vaccine against heterologous strains of type A FMD virus. *Veterinariya.* 2016; 2: 16–19. eLIBRARY ID: 25522294. (in Russ.)
25. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *WOAH. Terrestrial Animal Health Code.* 2022; Chapter 3.1.8. Available at: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.

Поступила в редакцию / Received 25.01.2023

Поступила после рецензирования / Revised 28.02.2023

Принята к публикации / Accepted 20.03.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Михалишин Дмитрий Валерьевич, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Михалишин Валерий Васильевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, Россия; AuthorID: 768290, Scopus Author ID: 14027142200, e-mail: mihalishin@arriah.ru.

Гочмурадов Ылхас Мурадович, аспирант, ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2508-8411>, e-mail: gochmuradov@arriah.ru.

Елькина Юлия Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2986-8992>, e-mail: elkina_ys@arriah.ru.

Dmitry V. Mikhailishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Valery V. Mikhailishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; AuthorID: 768290, Scopus Author ID: 14027142200, e-mail: mihalishin@arriah.ru.

Ykhas M. Gochmuradov, Postgraduate Student, Veterinarian, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2508-8411>, e-mail: gochmuradov@arriah.ru.

Yulia S. El'kina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2986-8992>, e-mail: elkina_ys@arriah.ru.