

# COMMISSION TRIALS OF THE MANUFACTURING TECHNOLOGY, AND PHYSICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES, OF A NOVEL LIVE MODIFIED COLD-ADAPTED VIRAL VACCINE AGAINST EQUINE INFLUENZA

**Tabynov K. K., Assanzhanova N.N., Ryskeldinova Sh.Zh., Kozhamkulov Y.M.,  
Inkarbekov D.A., Kydyrbayev Zh.**

*The Research Institute for Biological Safety Problems  
Gvardeiskiy, Kordaiskiy rayon, Zhambul'skaya oblast, 080409, Kazakhstan  
tabynov\_81@mail.ru; tabynov\_81@biosafety.kz*

## ABSTRACT

We developed a novel live modified viral vaccine for specific prophylaxis of equine influenza virus subtype H3N8, based on the reassortant cold-adapted strain, A/HK/Otar/6:2/2010. Previously we performed all stages of vaccine development, from a battery of laboratory studies, to isolating the vaccine strain, up to evaluation of vaccine safety and effectiveness in horses. The next important step is to summarise the laboratory studies and to confirm compliance of the properties of the developed vaccine with the requirements (specification) of the normative and technical documentation (NTD) draft for vaccine preparation. The results of this study will determine the potential for use of the vaccine in compliance with the NTD for approval by the authorized state body in the field of veterinary medicine.

The process of manufacturing and quality control of the finished vaccine was carried out in accordance with an approved program, which was based on the draft NTD for the vaccine. The studies demonstrated that a laboratory series of vaccine (13,400 vials or 134,000 doses), prepared according to the developed methodology, met the requirements of the draft NTD completely with regards to quality parameters including appearance, the presence of impurities, vacuum, solubility, pH, mass fraction of humidity, sterility, infectious activity, safety and immunogenicity. The vaccine, therefore, withstood the commission trials. The results of these commission trials of a novel live modified cold-adapted viral vaccine against equine influenza will subsequently be presented for agreement and approval, according to the draft NTD. Keywords: equine influenza, vaccine, cold-adapted strain, normative and technical documentation, physical properties, safety, immunogenicity, commission trials.

Keywords: equine influenza, vaccine, cold-adapted strain, normative and technical documentation, physical properties, safety, immunogenicity, commission trials.

УДК 619:363.1:616.921.5

## КОМИССИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ, ФИЗИЧЕСКИХ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НОВОЙ ЖИВОЙ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА ЛОШАДЕЙ

**Табынов К.К., Асанжанова Н.Н., Рыскельдинова Ш.Ж.,  
Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Кыдырбаев Ж.**

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности  
п.г.т. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Казахстан  
tabynov\_81@mail.ru; tabynov\_81@biosafety.kz*

## АБСТРАКТ

Для специфической профилактики вируса гриппа лошадей субтипа H3N8 разработана новая живая вакцина на основе реассортантного холодоадаптированного штамма A/HK/Otar/6:2/2010. Ранее был проведен целый комплекс лабораторных исследований от получения вакцинного штамма до изучения безопасности и эффективности вакцины на лошадях. Следующим важным и подытоживающим этапом лабораторных исследований является комиссионное подтверждение свойств разработанной вакцины на предмет соответствия требованиям (спецификации) проекта нормативно-технической документации (НТД) препарата. Результаты этих исследований определяют возможность согласования и утверждения государственным уполномоченным органом в области ветеринарии НТД на вакцину.

Процесс изготовления и контроль качества готового препарата вакцины осуществлялся в соответствии с программой комиссионного испытания, которая в свою очередь составлялась на основе проекта НТД вакцины. Проведенные исследования показали, что лабораторная серия живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей (13400 ампул или 134000 доз), приготовленная по разработанной технологии, по таким параметрам качества как внешний вид, наличие посторонней примеси, вакуума, растворимость, рН, массовая доля влаги, стерильность, инфекционная активность, безвредность и иммуногенность полностью отвечает требованиям проекта НТД. Вакцина выдержала комиссионные испытания. Результаты настоящих комиссионных испытаний новой живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей в последующем позволили представить, согласовать и утвердить в установленном порядке комплект НТД на биопрепарат.

Ключевые слова: грипп лошадей, вакцина, холодоадаптированный штамм, нормативно-техническая документация, физические свойства, безвредность, иммуногенность, комиссионные испытания.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа лошадей (ВГЛ) является ведущей причиной болезней органов дыхания у лошадей. Различают два субтипа ВГЛ: H7N7 и H3N8. Несмотря на то, что ВГЛ субтипа H7N7 в последние годы не регистрируется, ВГЛ субтипа H3N8 на сегодня является серьезной угрозой здоровью лошадей и экономической проблемой для всего коневодства [1].

Основным звеном в системе противоэпизоотических мер при гриппе лошадей является специфическая профилактика инфекции. При этом стратегия вакцинации против гриппа лошадей в настоящее время сводится к применению инактивированных и живых вакцин. Оба типа вакцин нашли широкое применение в ветеринарной практике. Однако, из-за известных недостатков инактивированных вакцин (слабая иммуногенность, непродолжительный иммунитет, многократное введение, реактогенность) [2, 3] и отсутствия их у живых аттенуированных и векторных вакцин [4, 5], разработка живых вакцин стала главным подходом в создании эффективных препаратов против гриппа лошадей.

Учитывая вышеизложенное, научным коллективом НИИПББ КН МОН РК для специфической профилактики ВГЛ субтипа H3N8 была разработана живая вакцина на основе реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010 со структурой генома 6:2 (6 генов от донора и 2 гена от актуального вируса). Указанный штамм получен методом классической генетики из штаммов: донора аттенуации А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) и эпизоотически актуального вируса А/лошадь/Отар/764/07(H3N8). Значимое преимущество данного типа вакцины заключается в том, что холодоадаптированный штамм эффективно репродуцируется в верхних дыхательных путях лошадей, где вызывает местные и системные иммунные ответы. При этом вакцинные штаммы неспособны размножаться при высоких температурах нижних дыхательных путей, где репликация дикого вируса обычно сопровождается развитием бронхита, пневмонии и отека легких [5].

Ранние исследования на лошадях, в том числе жеребых кобылах, показали, что разработанная живая холодоадаптированная вакцина полностью безопасна, иммуногенна (формирует секреторные антитела IgA и Т-клеточный иммунный ответ) и обеспечивает хорошую защиту, как от гомологичного [6], так и гетерологичного вирулентного штамма ВГЛ субтипа H3N8 [7]. Более того, вакцина у однократно привитых лошадей формирует протективный иммунный ответ с продолжительностью 12 месяцев. Что еще более важно, данная вакцина отвечает критериям стратегии DIVA, то есть позволяет дифференцировать инфицированных лошадей от вакцинированных животных [7].

Таким образом, в результате комплекса исследований, включающих получение вакцинного штамма [8], изучение его репродуктивных свойств [9], а также безопасности и эффективности на лабораторных животных [10] и лошадях [6, 7, 11, 12], была разработана новая живая холодоадаптированная вакцина против гриппа лошадей. Следующим важным и подытоживающим этапом лабораторных исследований является комиссионное подтверждение свойств разработанной вакцины на предмет соответствия требованиям (спецификации) проекта нормативно-технической документации (НТД) препарата. Следует отметить, что результаты этих исследований определяют возможность согласования и утверждения государственным уполномоченным органом в области ветеринарии НТД на вакцину. Исходя из этого, целью настоящего исследования являлось комиссионное испытание технологии изготовления, физических и иммунобиологических характеристик разработанной живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Приготовление вакцины*

Нативным вирусосодержащим материалом посевной раскладки рекомбинантного холодоадаптированного штамма А/НК/Отар/6:2/2010(H3N8) заражали 10-суточные куриные эмбрионы в дозе 10000 ЭИД<sub>50</sub> в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл. Инфицированные эмбрионы инкубировали при

температуре  $34,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха  $65,0 \pm 5,0$  в течение 48 ч. После чего эмбрионы охлаждали до  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  и использовали для сбора аллантоисной жидкости. Накопленную вирусосодержащую аллантоисную жидкость объединяли со стабилизирующей средой, содержащей 6%-ный пептон и 3%-ную лактозу в конечной концентрации. Полученную таким образом вакцинную жидкость перемешивали и выдерживали при температуре  $4,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  в течение 12 ч для контакта с антибиотиками, а затем разливали по 1 мл в ампулы и подвергали сублимационному высушиванию с последующим запаиванием ампул.

### ***Проведение технического и биологического контроля***

#### ***Определение внешнего вида***

Для определения внешнего вида ампулы с вакциной визуально осматривали. Содержимое ампул должно быть серовато-белого цвета, в виде таблеток однородной массы, без посторонней примеси.

#### ***Определение вакуума***

Вакуум определяли по ГОСТ 28083-89 с помощью аппарата типа Д<sup>1</sup>Арсонваль по фиолетовому свечению.

#### ***Определение концентрации водородных ионов (pH)***

Значение pH устанавливали по двум измерениям каждой пробы, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,1 единицы; pH вакцины должна быть в пределах 7,2-7,6.

#### ***Определение массовой доли влаги***

Массовую долю влаги определяли по ГОСТ 24061-89. Данный показатель вакцины не должен превышать 3%.

#### ***Определение растворимости***

Для определения растворимости содержимое 3 ампул с вакциной восстанавливали до исходного уровня с физиологическим раствором. Вакцина должна раствориться в течение 1-2 минуты.

#### ***Определение стерильности***

Стерильность вакцины определяли по ГОСТ 28085-89. Вакцина должна быть стерильной.

#### ***Определение инфекционной активности***

Инфекционную активность вакцины определяли на 10-суточных куриных эмбрионах общепринятым методом. Титр вируса высчитывали по методу Рида и Менча [13], и выражали в  $\log_{10}\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ . Инфекционная активность вакцины должна быть не ниже чем  $8,0 \log_{10}\text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ .

### ***Определение безвредности вакцины на мышах***

Безвредность вакцины проверяли на беспородных белых мышах самках весом 18-22 г. Для этого вакцину в дозе  $7,0 \log_{10}\text{ЭИД}_{50}$  вводили мышам ( $n=10$ ) интраназально в объеме 50 мкл в каждый носовой ход под эфирным наркозом. Мышам контрольной группы ( $n=10$ ) вместо вакцины аналогичным образом вводили физиологический раствор. За мышами опытной и контрольной групп вели клиническое наблюдение в течение 10 сут. с ежедневным измерением массы тела животных. Через 24 часа, 4 сут. и 10 сут. по 2 мыши опытной и контрольной групп подвергали патологоанатомическому вскрытию.

По результатам клинического наблюдения, приросту массы тела животных и патологоанатомического вскрытия после вакцинации определяли безвредность вакцины.

### ***Определение безвредности вакцины на лошадях***

Безвредность вакцины определяли в соответствии с требованиями Международного эпизоотического бюро (МЭБ) [14] на жеребятках. Для этого жеребяткам 1,5-годовалого возраста, серонегативным к вирусу гриппа субтипа Н3, интраназально с помощью шприца-распылителя вводили вакцину по 1 мл в каждую ноздрю в дозе  $8,0 \log_{10}\text{ЭИД}_{50}/\text{животное}$ . Жеребяткам из группы негативного контроля аналогичным образом вводили физиологический раствор.

Наблюдение за общим клиническим состоянием животных опытной и контрольной групп проводили в течение 4 недель. При этом клиническое состояние здоровья животных оценивали по балльной системе [15] по следующим параметрам.

Общее состояние: общее состояние в норме (0); недуг/депрессия/нормальный аппетит (1), недуг/депрессия/понижение аппетита (2); обезвоживание (2); истощение (4); неспособность стоять (30); на грани смерти (50) и гибель (100).

Наблюдение за дыханием: учащенное дыхание (2); одышка (4); кашель: 2-5 раз в 10 минут (1), 6-20 раз в 10 минут (2), больше чем 20 раз в 10 минут (3).

Наблюдение за состоянием глаз: слезотечение (1); умеренное слизисто-гнойное выделение (2), сильное слизисто-гнойное выделение (4); умеренный конъюнктивит (2), сильный конъюнктивит (4).

Наблюдение за состоянием носа: выделение серозной слизи из носа (1); умеренное слизисто-гнойное выделение из носа (2), сильное слизисто-гнойное выделение из носа (4); чихание 2-5 раз в 10 минут (1), 6-20 раз в 10 минут (2), больше чем 20 раз в 10 минут (3).

Ректальная температура: диапазон температуры между  $38,5$  и  $39,0^\circ\text{C}$  (1), между  $39,1$  и  $39,5^\circ\text{C}$  (2) и между  $39,6$  и  $40,0^\circ\text{C}$  (3).

### ***Определение иммуногенности вакцины***

Иммуногенность вакцины проверяли на морских свинках самках весом 320-360 г. Для этого морским свинкам (n=10) вводили интраназально вакцину в дозе  $7,0 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub> в объеме 100 мкл в каждый носовой ход. Одновременно морским свинкам контрольной группы (n=5) интраназально вводили такой же объем физиологического раствора. За опытной и контрольной группами животных вели клиническое наблюдение в течение 21 суток. На 21 сутки после иммунизации у животных опытной и контрольной групп брали образцы крови для определения уровня накопления антител к вирусу гриппа лошадей субтипа Н3 в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА ставили по ранее описанной методике [10].

Вакцину считали иммуногенной, если на 21 сут. после вакцинации у не менее чем 70% привитых морских свинок наблюдалось накопление антител к вирусу гриппа лошадей субтипа Н3 в титре 1:16 и выше.

#### **Статистическая обработка**

Определяли среднеарифметическое или среднегеометрическое значение выборки и ее среднеквадратичную ошибку. Достоверность различий между показателями определяли с применением критерия Стьюдента с использованием программы Graphpad Prism Software, version 6.0 (Graphpad Software Inc., CA, USA). Значение  $P < 0,05$  считали достоверным.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### *Приготовление вакцины*

По результатам проведенных работ была наработана вирусосодержащая аллантаисная жидкость рекомбинантного холодоадаптированного штамма А/НК/Otar/6:2/2010(Н3N8) в объеме 7000 мл. Данный вирусный материал после объединения со стабилизирующей средой с антибиотиками был расфасован в ампулы по 1,0 мл и высушен на сублимационной установке. Размер приготовленной лабораторной серии вакцины составил 13456 ампул.

#### *Технический и биологический контроль вакцины*

Результаты контроля качества вакцины (таблица 1) показали, что вся лабораторная серия препарата (13400 ампул) по таким параметрам качества как внешний вид, наличие посторонней примеси, вакуума, растворимость, рН, массовая доля влаги, стерильность и инфекционная активность, полностью соответствует требованиям проекта НТД вакцины.

**Таблица 1.** Результаты технического и биологического контроля вакцины

**Table 1.** Results of the technical and biological tests of the vaccine

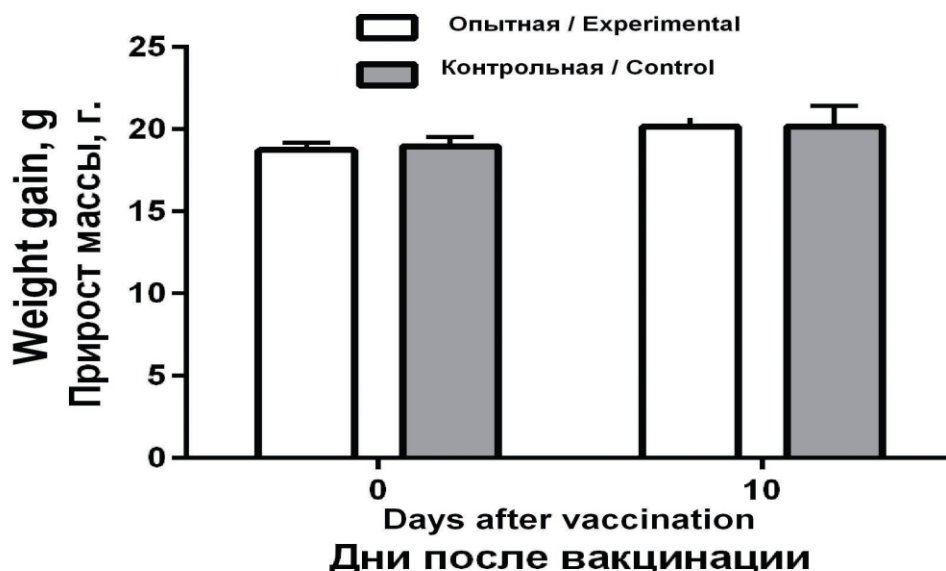
Наименование параметра Name of parameter	Характеристика и норма по спецификации Characteristics and normal values according to specification	Результат контроля Control results
Внешний вид Appearance	Однородная мелкопористая масса серовато-белого или серовато-желтого цвета  The homogeneous microporous mass with grayish-white or grayish-yellow color	Соответствуют 13456 ампул  Complies of 13456 ampoules
Наличие посторонней примеси, плесени и трещин ампул The presence of an impurity, mold and cracks in ampoules	Не допускается  Not allowed	Соответствуют 13456 ампул  Complies of 13456 ampoules
Наличие вакуума в ампулах The presence of vacuum in ampoules	При проверке аппаратом типа Д <sup>1</sup> Арсенваля должно быть фиолетово-синее свечение, сопровождающееся характерным потрескиванием  When testing in the D <sup>1</sup> Arsonval apparatus should be violet-blue glow which accompanied by a characteristic crackling	Соответствуют 13400 ампул  Complies of 13400 ampoules

<p>Время ресуспендирования (растворимость)</p> <p>Resuspension time (solubility)</p>	<p>Содержимое ампул должно растворяться в физиологическом растворе хлористого натрия в течение 1,0-1,5 мин и представлять однородную взвесь</p> <p>The contents of vials should be dissolved in a physiological sodium chloride solution for 1.0-1.5 min and provide a homogeneous slurry</p>	<p>Соответствует, растворились в течение 1 мин. и образовали однородную взвесь</p> <p>Complies; the contents of the ampoules were dissolved within 1 min and formed a homogeneous slurry</p>
<p>Концентрация водородных ионов (pH)</p> <p>The concentration of hydrogen ions (pH)</p>	<p>7,2-7,6</p>	<p>7,2</p>
<p>Массовая доля влаги, %</p> <p>Moisture content, %</p>	<p>Не более 3,0</p> <p>Not more than 3,0</p>	<p>2,12±0,08</p>
<p>Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой (стерильность)</p> <p>Contamination with bacterial and fungal microflora (sterility)</p>	<p>Высевы вакцины на питательные среды МПА, МПБ, Сабуро должны быть без роста аэробной, анаэробной и грибковой микрофлоры</p> <p>The vaccine seeding in IPA, BCH and Saburo nutrient medias must be free of aerobic, anaerobic and fungal microflora growth</p>	<p>Стерильна</p> <p>Sterile</p>
<p>Инфекционная активность</p> <p>The vaccine titer</p>	<p>Биологическая активность вакцины при титровании на 10-11-сут. куриных эмбрионах должна быть не ниже <math>10^{8,0}</math> ЭИД<sub>50</sub>/мл</p> <p>The vaccine titer in 10-11-day chicken embryos should not be less than <math>10^{8,0}</math> EID<sub>50</sub>/ml</p>	<p><math>9,2 \pm 0,14 \log_{10}</math> ЭИД<sub>50</sub>/мл</p> <p><math>9,2 \pm 0,14 \log_{10}</math> EID<sub>50</sub>/ml</p>

#### *Безвредность вакцины на мышах*

Результаты испытаний показали, что в течение всего периода наблюдения все мыши остались живы и ни у одной из них не были выявлены видимые признаки заболевания. Отмечался существенный прирост массы (от 0,2 до 2,3 г,  $P=0,03-0,07$ ) всех мышей опытной и контрольной групп (рисунок 1) в день окончания наблюдения (на 10 день опыта) по сравнению с исходными данными. При этом средняя масса мышей в испытуемых группах в дни наблюдения была одинаковой и не имела достоверных различий ( $P>0,05$ ) между собой.

При патологоанатомическом вскрытии мышей на 1, 4 и 10 сут. после вакцинации установлено, что вакцина не оказывает на них негативного воздействия, о чем свидетельствует протокол вскрытия, приведенный ниже.



**Рис. 1.** Средняя масса тела мышей в опытной и контрольной группах на 0 и 10 сутки после однократной вакцинации

**Fig. 1.** The average body weight of mice in experimental and control groups on days 0 and 10 after a single vaccination

#### *Наружный осмотр*

Патологоанатомическому вскрытию подвергались:

- трупы 6 мышей из опытной группы, привитой вакциной, и 6 трупов мышей из контрольной группы, привитой физиологическим раствором.

Шерсть опытных мышей имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения. На месте введения препарата какие-либо признаки гиперемии, эрозий не установлены. Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы имели овальную форму, однородно розоватой или желтоватой окраски, умеренной плотности.

Поверхностные лимфатические узлы (предлопаточные, надколенные, подчелюстные) значительно увеличены, серовато-красного цвета, плотноватой консистенции, на разрезе рисунок сглажен. Щитовидная железа плотно была прижата к гортани, имела обычные размеры и плотности, розовато-красноватого цвета.

Слизистая оболочка ротовой полости, глотки серовато-белого цвета.

Слизистая оболочка гортани серовато-белого цвета.

#### *Внутренний осмотр*

Положение органов грудной и брюшной полостей анатомически правильное.

Тимус имел треугольную форму, беловатую окраску, умеренно плотной консистенции.

Сердце – перикард и эпикард гладкие, блестящие, миокард коричневатого цвета, плотноватой консистенции. Эндокард гладкий, в просвете правого и левого сердца имелось незначительное количество несвернувшейся крови.

Легкие эластичны, в диафрагмальных, верхушечных долях легких имелись покрасневшие участки, на разрезе рисунок легких сохранен, у отдельных особей сосуды легких были полнокровными.

Селезенка обычного размера, темно-вишневого цвета с гладкой поверхностью, плотноватой консистенции, на разрезе рисунок сохранен.

Печень красно-коричневого цвета, размеры не увеличены, умеренно плотной консистенции, на разрезе рисунок сохранен, у отдельных мышей сосуды печени были полнокровными.

Почки обычного размера, капсула снимается легко, на разрезе граница коркового и мозгового слоев выражена.

Желудок имел обычную форму и размеры, в просвете содержались кормовые массы. Слизистая желудка бледно-розового цвета, иногда со складками.

Поджелудочная железа бледно-розового цвета, дольчатая.

Слизистая оболочка тонкого отдела кишечника без каких-либо изменений, покрыта слизью сероватого цвета.

Мезентериальные лимфатические узлы едва заметны, брыжеечные кровеносные сосуды умеренного наполнения.

Мочевой пузырь сокращен или наполнен мочой. Слизистая серовато-белого цвета.

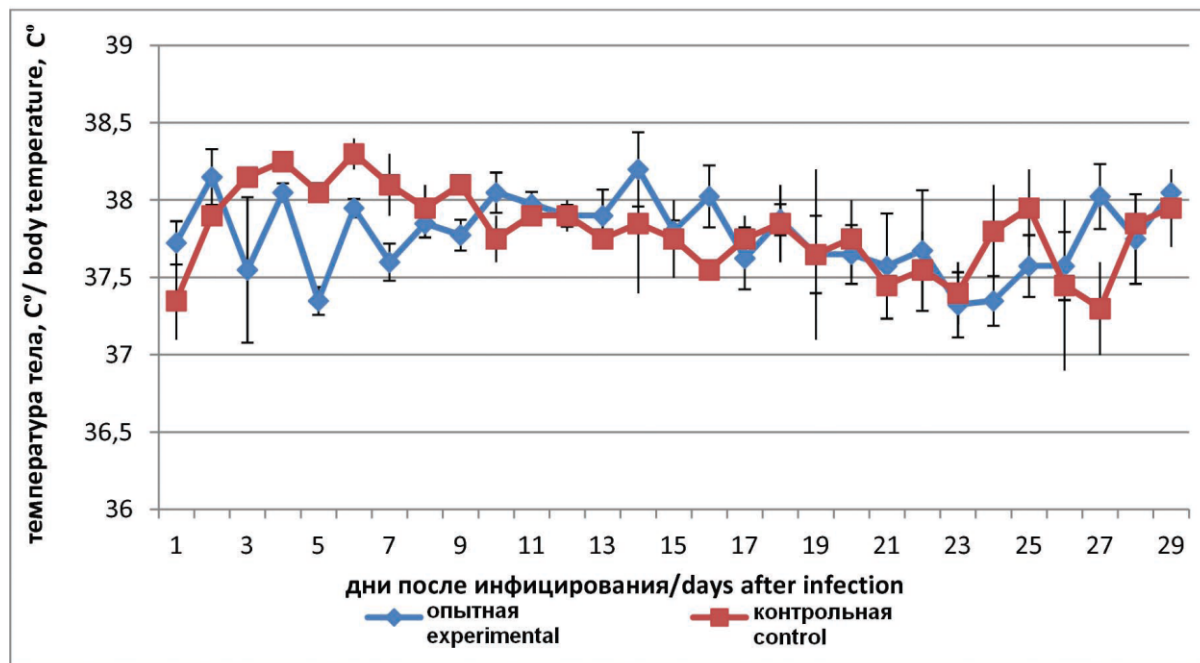
Головной мозг – оболочки головного мозга были тонкими и прозрачными, вещество головного мозга имело умеренную плотность, расширение желудочков мозга не наблюдалось.

Форма, размеры и плотность надпочечников, яичников или яичек не отличались от контроля.

#### *Безвредность вакцины на лошадях*

Результаты клинических исследований показали, что общее состояние привитых жеребят опытной и контрольной групп в течение 28 сут. наблюдения было в пределах нормы, слезотечение, слизисто-гнойное выделение, признаки конъюнктивита или истечение из носа у инфицированных жеребят не наблюдались. Следовательно, клинические признаки, оцениваемые по балльной системе, в опытной и контрольной группе животных равнялись нулю.

Проведенная вакцинация не вызвала температурную реакцию как в опытной, так и в контрольной группе животных (рисунок 2). Температурные значения опытной и контрольной групп не имели достоверных различий ( $P>0,05$ ) и на протяжении всего срока наблюдения были в пределах нормы (37,5-38,5°C).



**Рис. 2.** Динамика изменения температуры тела жеребят опытной и контрольной групп после иммунизации живой холодоадаптированной вакциной против вируса гриппа лошадей субтипа H3N8

**Fig. 2.** Changes in the body temperatures of foals in the experimental and control groups after immunisation with cold-adapted live modified virus vaccine against equine influenza subtype H3N8

#### *Иммуногенность вакцины*

Результаты испытаний (рисунок 3) показали, что вакцина иммуногенна, так как у 100% привитых морских свинок на 21 сут. после вакцинации наблюдалось существенное ( $P=0,01$ ) накопление антител к вирусу гриппа лошадей субтипа H3 в титре от 1:40 до 1:640 (СГТ  $105\pm 59$ ) в РТГА. При этом в образцах сыворотки крови контрольной группы животных антитела к вирусу гриппа лошадей в РТГА обнаружены не были.





этого донора ранее получены реассортантные штаммы, содержащие поверхностные антигены вируса гриппа А различных субтипов А/SPb/НК/09 (H1N1), А/Astana/НК/2009 (H5N1) и А/Perth/НК/2011 (H3N2) [19]. Выбор этого донора аттенуации был неслучаен, так как он позволяет получать не только безопасные и иммуногенные вакцинные штаммы, но и вирусы с высокой репродуктивной активностью. К примеру, титр инфекционной активности штамма А/НК/Отар/6:2/2010 при культивировании на куриных эмбрионах стабильно составляет  $9.0 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл и выше.

Как уже ранее отмечалось, с целью создания безопасной и эффективной вакцины против гриппа лошадей в НИИПББ КН МОН РК был с успехом проведен комплекс лабораторных исследований, начиная от получения вакцинного штамма и завершая изучением безопасности и эффективности готового препарата на лошадях. Предмет изучения настоящих исследований является завершающим этапом цикла лабораторных исследований, нацеленных на разработку вакцины. По сути, результаты данной работы могут создать реальные предпосылки для полевого испытания вакцины с последующим ее внедрением в производство.

Процесс изготовления и контроль качества готового препарата вакцины осуществлялся в строгом соответствии с утвержденной генеральным директором института программой, которая в свою очередь составлялась на основе проекта НТД вакцины. Проведенные исследования показали, что лабораторная серия живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей в объеме 13400 ампул или 134000 доз, приготовленная по разработанной технологии, по таким параметрам качества как внешний вид, наличие посторонней примеси, вакуума, растворимость, рН, массовая доля влаги, стерильность, инфекционная активность, безвредность и иммуногенность полностью отвечает требованиям проекта НТД. Следует отметить, что во время испытания безопасности вакцины на лошадях не оценивалась ее иммуногенность. Причиной этому служит то, что вакцина у интраназально привитых лошадей не формирует образование сывороточных антител в РТГА, при этом протективность вакцины главным образом обуславливается созданием Т-клеточного иммунного ответа [6]. То есть в данном случае эффективность разработанной вакцины можно определить лишь с помощью оценки уровня Т-клеточного иммунного ответа или посредством контрольного заражения вакцинированных животных вирулентным штаммом ВГЛ. Оба указанных способа оценки эффективности вакцины требуют существенных материальных затрат и продолжительны по времени выполнения. Поэтому включение их в рутинную систему контроля качества вакцины на стадии промышленного производства препарата существенно повысит ее конечную стоимость, и, следовательно, негативно отразится на ее конкурентоспособности. Исходя из этого, в соответствии с проектом НТД испытания на лошадях проводятся лишь для оценки безопасности вакцины, а иммуногенность оценивается только лишь на морских свинках. В процессе разработки вакцины мы установили, что результаты иммуногенности препарата (титр антител в РТГА 1:16 и выше), полученные на морских свинках, хорошо сопоставимы с данными по степени защиты вакцинированных лошадей от экспериментальной гриппозной инфекции (неопубликованные данные).

Результаты настоящих комиссионных испытаний технологии изготовления, физических и иммунобиологических характеристик новой живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей в последующем позволили представить, согласовать и утвердить в установленном порядке комплект НТД на биопрепарат.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, установлено, что лабораторная серия живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей в объеме 134000 доз, приготовленная по разработанной технологии, по таким параметрам качества как внешний вид, наличие посторонней примеси, вакуума, растворимость, рН, массовая доля влаги, стерильность, инфекционная активность, безвредность и иммуногенность полностью отвечает требованиям проекта НТД. Вакцина выдержала комиссионные испытания.

В 2016-2017 гг. планируется провести полевые испытания безопасности и протективности вакцины в условиях коневодческих хозяйств Казахстана.

## **Финансирование**

Исследования проводились при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках научной программы О.0534 «Грипп лошадей: эпизоотологический мониторинг, разработка средств специфической профилактики и диагностики» на 2010-2012 гг. по направлению «Разработка высокоэффективных средств специфической профилактики гриппа лошадей».

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Сидорчук А.А., Бессарабов Б.Ф., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных. – М.: Колос, 2007. – 671 с.

2. Paillot R., Hannant D., Kydd J.H., Daly J.M. Vaccination against equine influenza: Quid novi? // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, №19. – P. 4047-4061.
3. Wilson W.D. Equine influenza // *Vet Clin North Am Equine Pract.* – 1993. – Vol. 9, №2. – P. 257-282.
4. Chambers T.M., Holland R.E., Tudor L.R., Townsend H.G.G. et al. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge // *Equine Vet J.* – 2001. – Vol. 33, №7. – P. 630-636.
5. Townsend H.G., Penner S.J., Watts T.C. et al. Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials // *Equine Vet J.* – 2001. – Vol. 33, №7. – P. 637-643.
6. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Ryskeldinova Sh., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarbekov D., Sansyzbay A. The safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine // *Australian veterinary journal.* – 2014. – Vol. 92, №11. – P. 450-457.
7. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Ryskeldinova Sh., Assanzhanova N., Sansyzbay A. Duration of the protective immune response after prime and booster vaccination of yearlings with a live modified cold-adapted viral vaccine against equine influenza // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32, №25. – P. 2965-2971.
8. Chervyakova O.V., Strochkov V.M., Tailakova E.T., Sultankulova K.T. et al. Recombinant Strain A/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) for Development of a Live Intranasal Equine Influenza Vaccine // *Journal of Equine Veterinary Science.* – 2014. – Vol. 34, №6. – P. 749-758.
9. Асанжанова Н.Н., Табынов К.К., Кыдырбаев Ж.К., Рыскельдинова Ш.Ж. Сравнительное изучение репродуктивных свойств клонов реассортантного холодоадаптированного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа на куриных эмбрионах // *Материалы первой научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности», посв. дню образования Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности.* – п.г.т. Гвардейский, 2012. – С. 21-29.
10. Асанжанова Н.Н., Табынов К.К., Кыдырбаев Ж.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А. Изучение безвредности и иммуногенности клонов реассортантного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) вируса гриппа на модели лабораторных животных // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2012. – №1. – С. 69-76.
11. Табынов К.К., Кыдырбаев Ж.К., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Асанжанова Н.Н., Рыскельдинова Ш.Ж. Определение инфицирующей дозы эпизоотического штамма А/лошадь/Otar/764/07 (H3N8) вируса гриппа для лошадей // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2011. – №4. – С. 110-114.
12. Табынов К.К., Кыдырбаев Ж.К., Сансызбай А.Р., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А. Экспериментальное изучение безвредности и иммуногенности холодоадаптированного реассортантного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 вируса гриппа на лошадях // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии.* – 2012. – №3. – С. 87-99.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Am J Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
14. OIE. Terrestrial manual equine influenza. – 2008, chapter 2.5.7. – P. 877- 881.
15. Heldens G.M., Pouwels H.G.W., Derks C.G.G., Van de Zande S.M.A., Hoes-jmakers M.J.H. The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, №40. – P. 5530-5537.
16. Кыдырманов А.И., Кумекбаева Ж.Ж., Карамендин К.О. и др. Изоляция вируса гриппа А (H3N8) от лошадей в Казахстане в 2007 г. // *Ветеринария.* – 2009. – №5. – С. 52-54.
17. OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition, OIE Headquarters. <http://www.oie.int> 4. March 2013.
18. Soboll G., Nelson K.M., Leuthner E.S., Clark R.J. et al. Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21, №21-22. – P. 3081-3092.
19. Потапчук М.В., Репко И.А., Сергеева М.В., Коротков А.В. и др. Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/HongKong/1/68/162/35 (H3N2) // *Вопросы вирусологии.* – 2012. – Т. 57, № 6. – С. 42-46.

## REFERENCES

1. Sidorchuk A.A., Bessarabov B.F., Voronin E.S. *Infekcionnye bolezni zhivotnyh. M., Kolos, 2007, 671 p.*
2. Paillot R., Hannant D., Kydd J.H., Daly J.M. Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 19, pp. 4047-4061. PMID: 16545507. doi:10.1016/j.vaccine.2006.02.030.
3. Wilson W.D. Equine influenza. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1993, vol. 9, no. 2, pp. 257-282. PMID: 8358645.
4. Chambers T.M., Holland R.E., Tudor L.R., Townsend H.G.G. et al. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine Vet J*, 2001, vol. 33, no. 7, pp. 630-636. PMID: 11770982. DOI: 10.2746/042516401776249291.
5. Townsend H.G., Penner S.J., Watts T.C. et al. Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine Vet J*, 2001, vol. 33, no. 7, pp. 637-643. PMID: 11770983. DOI: 10.2746/042516401776249354.

6. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Ryskeldinova Sh., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarebekov D., Sansyrbay A. The safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine. *Aust Vet J*, 2014, vol. 92, no. 11, pp. 450-457. PMID: 25348146. DOI: 10.1111/avj.12248.
7. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Ryskeldinova Sh., Assanzhanova N., Sansyrbay A. Duration of the protective immune response after prime and booster vaccination of yearlings with a live modified cold-adapted viral vaccine against equine influenza. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 25, pp. 2965-2971. PMID: 24726250. DOI:10.1016/j.vaccine.2014.03.095.
8. Chervyakova O.V., Stochkov V.M., Tailakova E.T., Sultankulova K.T. et al. Recombinant Strain A/HK/Otar/6:2/2010 (H3N8) for Development of a Live Intranasal Equine Influenza Vaccine. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2014, vol. 34, no. 6, pp. 749-758. DOI:10.1016/j.jevs.2014.01.003.
9. Asanzhanova N.N., Tabynov K.K., Kydyrbaev Zh.K., Ryskel'dinova Sh.Zh. Sravnitel'noe izuchenie reproduktivnyh svojstv klonov reassortantnogo holodoadaptirovannogo shtamma A/HK/Otar/6:2/2010 (H3N8) virusa grippa na kurinyh jembrionah // Materialy pervoj nauchno-prakticheskoj konferencii molodyh uchenykh «Aktual'nye problemy i perspektivy biologicheskoy bezopasnosti», posvjashhennoj ko dnju obrazovaniya Nauchno-issledovatel'skogo instituta problem biologicheskoy bezopasnosti. Gvardejskij, 2012, pp. 21-29.
10. Asanzhanova N.N., Tabynov K.K., Kydyrbaev Zh.K., Ryskel'dinova Sh.Zh., Kozhamkulov E.M., Inkarebekov D.A. Izuchenie bezvrednosti i immunogenosti klonov reassortantnogo shtamma A/HK/Otar/6:2/2010 (H3N8) virusa grippa na modeli laboratornyh zivotnyh. *Biotehnologija. Teorija i praktika*, 2012, no. 1, pp. 69-76.
11. Tabynov K.K., Kydyrbaev Zh.K., Kozhamkulov E.M., Inkarebekov D.A., Asanzhanova N.N., Ryskel'dinova Sh.Zh. Opredelenie inficirujushhej dozy jepizooticheskogo shtamma A/loshad'/Otar/764/07 (H3N8) virusa grippa dlja loshadej. *Biotehnologija. Teorija i praktika*, 2011, no. 4, pp. 110-114.
12. Tabynov K.K., Kydyrbaev Zh.K., Sansyrbaj A.R., Ryskel'dinova Sh.Zh., Asanzhanova N.N., Kozhamkulov E.M., Inkarebekov D.A. Jeksperimental'noe izuchenie bezvrednosti i immunogenosti holodoadaptirovannogo reassortantnogo shtamma A/HK/Otar/6:2/2010 virusa grippa na loshadjah. *Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii*, 2012, no. 3, pp. 87-99.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, vol. 27, pp. 493-497.
14. OIE. Terrestrial manual equine influenza. 2008, chapter 2.5.7, pp. 877-881.
15. Heldens G.M., Pouwels H.G.W., Derks C.G.G., Van de Zande S.M.A., Hoei-jmakers M.J.H. The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 40, pp. 5530-5537. PMID:19607950. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.06.085.
16. Kydyrmanov A.I., Kumekbaeva Zh.Zh., Karamendin K.O. Izoljacija virusa grippa A (H3N8) ot loshadej v Kazahstane v 2007 g. *Veterinarija*, 2009, no. 5, pp. 52-54.
17. OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition, OIE Headquarters. <http://www.oie.int> 4 March 2013.
18. Soboll G., Nelson K.M., Leuthner E.S., Clark R.J. et al. Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response. *Vaccine*, 2003, vol. 21, no. 21-22, pp. 3081-3092. PMID:12798652. DOI:10.1016/S0264-410X(03)00161-0.
19. Potapchuk M.V., Repko I.A., Sergeeva M.V., Korotkov A.V. et al. Harakteristika reassortantnyh shtammov virusa grippa na osnove novogo donora A/HongKong/1/68/162/35 (H3N2). *Voprosy virusologii*, 2012, vol. 57, no. 6, pp. 42-46. PMID: 23477254.

# **ЖЫЛҚЫ ТҰМАУЫНА ҚАРСЫ СУЫҚҚА БЕЙІМДЕЛГЕН ЖАҢА ТІРІ ВАКЦИНАНЫҢ ДАЙЫНДАУ ТЕХНОЛОГИЯСЫН, ФИЗИКАЛЫҚ ЖӘНЕ ИММУНОБИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН КОМИССИОНДЫ ТҮРДЕ ЗЕРТТЕУ**

**Табынов Қ.Қ., Асанжанова Н.Н., Рыскельдинова Ш.Ж.,  
Қожамқұлов Е.М., Инкарбеков Д.А., Қыдырбаев Ж.**

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты  
Гвардейск қ.т.к., Қордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409, Қазақстан  
tabynov\_81@mail.ru; tabynov\_81@biosafety.kz*

## **ТҮЙІН**

Жылқы тұмауы вирусының H3N8 субтипін алдын алу мақсатында А/НК/Отар/6:2/2010 суыққа бейімделген реассортантты штам негізінде жылқы тұмауына қарсы жаңа тірі вакцина даярланды. Алдыңғы зерттеулерде вакцина штамын алудан бастап, вакцинаның жылқылардағы қауіпсіздігі мен тиімділігін бағалайтын бірқатар кешендік зертханалық жұмыстары жүргізілді. Даярланған вакцина сапасының препараттың нормативтік-техникалық құжат (НТҚ) жобасы талаптарына сәйкестігін комиссияндық түрде растау аталған зертханалық зерттеулердің маңызды және қортындылайтын келесі сатысы болып табылады. Бұл зерттеулер нәтижесі вакцинаның НТҚ ветеринария саласындағы өкілетті мемлекеттік органмен үйлестіру және бекіту мүмкіндігін анықтайды.

Вакцинаның дайындау және сапасын бағалау процесі препараттың НТҚ жобасы негізінде дайындалған комиссияндық зерттеу жобасы бойынша жүргізілді. Зерттеу нәтижесі бойынша даярланған технология бойынша (13400 ампула немесе 134000 доза) жылқы тұмауына қарсы суыққа бейімделген тірі вакцинаның НТҚ жобадағы сыртқы түр, бөгде ластағыштардың болуы, вакуум, ерігіштігі, рН, ылғалдылық, стерилділік, инфекциялық белсенділік, қауіпсіздік және иммуногенділік талаптарына сәйкестігі көрсетілді. Вакцина комиссияндық зерттеуден өтті. Жылқы тұмауына қарсы суыққа бейімделген жаңа тірі вакцинаның комиссияндық зерттеу нәтижесі белгіленген тәртіп бойынша биопрепараттың НТҚ ұсынуына, үйлестіруіне және бекітуіне кейінірек септігін тигізді.

Негізгі сөздер: жылқы тұмауы, вакцина, суыққа бейімделген штамм, нормативтік-техникалық құжат, физикалық қасиет, зардапсыздық, иммуногендік, комиссиялық сынақ.