ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

Н. І. Шевченко^{1,2}, здобувач,
Ю. А. Собко¹, канд. вет. наук,
В. В. Недосеков², д-р вет. наук, професор

¹ТОВ «Біотестлаб»

вул. Володимирська, 57-А, м. Васильків, 08600, Україна

²Національний університет біоресурсів та природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
nshevchenko2727@gmail.com

Реалізація, зберігання та використання чутливих до дії високих та низьких температур вакцин є проблемою, яку можна мінімізувати шляхом посилення їх стабільності і як наслідок – покращення ефективності препарату. Живі ліофілізовані вакцини проти інфекційного бронхіту курей є досить чутливими до умов навколишнього середовища. Стабільність препарату залежить від ряду факторів: стійкості самого штаму вірусу, середовища висушування (стабілізатора), режиму ліофілізації та умов зберігання вакцин.

Одним із ключових компонентів є середовище висушування, що забезпечує захист у процесі ліофілізації, стабільність препарату протягом усього терміну зберігання та її ефективність під час застосування.

Метою дослідження було підібрати найбільш перспективні середовища висушування, що забезпечують стабільність вакцин на основі штамів H-120 і VAR2/V2 протягом необхідного терміну зберігання.

Отримано результати досліджень впливу різних середовищ висушування (стабілізаторів) на стабільність живих вакцин проти інфекційного бронхіту курей зі штамів H-120 і VAR2/V2 при температурі 2-8 °C і 37 °C. Результати досліджень показують, що стабілізатори, до складу яких входить пептон ферментативний та полівінілпіролідон (ПВП) забезпечують стабільність живих вакцин проти ІБК зі штамів H-120 і VAR2/V2 протягом 18-24 місяців при температурі 2-8 °C. У ході досліджень вивчено характер формування ліофілізату, його якість та розчинність.

У статті опубліковані фрагменти досліджень, що відносяться до технології виробництва живих вакцин ПОЛІМУН проти інфекційного бронхіту курей (ІБК). Автори з метою захисту технології представили максимально можливі для публікації дані щодо складу середовищ висушування.

Ключові слова: СТАБІЛІЗАТОР, СЕРЕДОВИЩЕ ВИСУШУВАННЯ, ІНФЕКЦІЙНА АКТИВНІСТЬ, ВАКЦИНА.

STUDY OF STABILITY OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

N. I. Shevchenko^{1,2}, Y. A. Sobko¹, V. V. Nedosekov²

¹«Biotestlab» Ltd.

Volodymyrska str., 57-A, Vasylkiv, 08600, Ukraine

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Heroiv Oborony str., 15, Kyiv, 03041, Ukraine

nshevchenko2727@gmail.com

The sale, storage and use of vaccines sensitive to high and low temperatures is a problem that can be minimized by enhancing their stability and, as a consequence, improving the effectiveness of the preparation. Live lyophilized vaccines against avian infectious bronchitis are quite sensitive to environmental conditions. The stability of the preparation depends on a number of factors: the stability of the virus strain, the drying media (stabilizer), the mode of lyophilization and storage conditions of vaccines.

One of the key components is the drying media, which provides protection during lyophilization, the stability of the preparation throughout the shelf life and its effectiveness during use.

The aim of the study was to select the most promising drying media that ensure the stability of vaccines based on strains H-120 and VAR2/V2 during the required shelf life.

The results of studies of the effect of different drying media (stabilizers) on the stability of live vaccines against avian infectious bronchitis from strains H-120 and VAR2/V2 at a temperature of 2-8°C and 37 °C. The results show that stabilizers, which include enzymatic peptone and polyvinylpyrrolidone (PVP) ensure the stability of live vaccines against IB from strains H-120 and VAR2/V2 for 18-24 months at a temperature of 2-8°C. The nature of lyophilisate formation, its quality and solubility were studied.

The article publishes fragments of research related to the technology of production of live vaccines POLIMUN against avian infectious bronchitis (IB). In order to protect the technology, the authors presented the maximum possible data on the composition of drying media.

Keywords: STABILIZER, DRYING MEDIA, INFECTIOUS ACTIVITY, VACCINE.

Збудник інфекційного бронхіту курей (ІБК) – РНК-геномний вірус, що належить до родини Coronaviridae (Otsuki et al., 1979; Kamau, 2010; Jackwood & de Wit, 2013). Внаслідок схильності до спонтанних мутацій вірус має багато серотипів і варіантів. Відомо безліч штамів вірусу ІБК і більше десятка штамів, з яких виготовляють живі вакцини для захисту курей проти захворювання. При цьому, для всіх вірусів сімейства характерна їх відносно низька стійкість у зовнішньому середовищі, при фізико-хімічному впливі і навіть у ліофілізованому вигляді. Питання стабільності живих ліофілізованих вакцин буде завжди актуальним. Найчастіше їх стабільність знаходиться в межах 12-18 місяців. Стабільність залежить від ряду факторів: стійкості самого штаму вірусу, середовища висушування (стабілізатора), режиму ліофілізації та умов зберігання вакцин.

Реалізація, зберігання та використання чутливих до дії високих та низьких температур вакцин є проблемою, яку можна мінімізувати шляхом посилення їх стабільності і як наслідок – покращення ефективності препарату (Kristensen, 2011).

Зниження стабільності вакцин у процесі досліджень може потенційно затримувати процес розробки препаратів. Щоб мінімізувати часові та матеріальні витрати, підходи до дослідження стабільності слід включити завчасно у процес розробки вакцини - таким чином уникаючи необхідності для додаткових клінічних випробувань та регуляторного схвалення.

Одним із ключових компонентів вакцини є середовище висушування, що забезпечує захист у процесі ліофілізації, стабільність препарату протягом усього терміну зберігання та ефективність під час застосування (Pishraft-Sabet et al., 2015; Cardoso et al., 2017; Keep et al., 2020).

Матеріали і методи. У якості живих антигенів використовували вірус ІБК штамів Н-120 і VAR2/V2 з відомими титрами інфекційної активності. На першому етапі для дослідження стабільності в якості моделі вірусу ІБК був обраний штам Н-120, так як з ним технологічно простіше проводити дослідження. Потім досліджували вплив відібраних кращих зразків середовищ на стабільність штаму VAR2/V2 у ліофілізованому вигляді.

Антигени змішували з відповідними стабілізаторами у співвідношенні 60% антигену та 40 % стабілізатора. Фасували у флакони формату R-6 по 2,0 мл та ліофілізували при відповідному режимі. Потім проводили оцінку якості ліофілізату та його розчинність. Втрату в масі при висушуванні у кожному зразку досліджували згідно з Е.Р. 9.3 07/2015: 2.2.32.

Визначали титр інфекційну активність (ІА) вірусу у кожному зразку відразу після ліофілізації. Дослідження стабілізуючих властивостей середовищ висушування визначали методом «прискороного старіння» шляхом прогрівання ліофілізованих зразків при температурі 37 °С протягом 3 і 5 діб та в умовах зберігання при 2-8 °С через 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30 місяців. Результати оцінювали за збереженням титру інфекційної активності.

Визначення титру інфекційної активності проводили на курячих ембріонах (КЕ) зі статусом ВПФ (фірми VALO BioMedia, Німеччина) шляхом введення послідовних 10-кратних розведень.

Приготовані розведення вірусу вводили починаючи з найбільшого розведення, до якого були розведенні досліджувальні зразки по 0,2 мл у яйце (в алантоїсну рідину курячих ембріонів). Інкубували ембріони протягом 48 год. Ембріони, які загинули в перші 24 год. після зараження, не враховували при підрахунку титру, оскільки це неспецифічна загибель. Ембріони, що загинули на 2 добу враховували як позитивний результат. Після закінчення терміну інкубації ембріони розміщували у холодильній камері з температурним режимом від 2 °С до 8 °С не менше 3-х годин для охолодження.

Після охолодження ембріонів із кожного КЕ відбирали проби алантоїсної рідини у відповідно марковану кріопробірку, починаючи з найбільшого розведення, змінюючи наконечник на новий для запобігання кросконтамінації. Проби алантоїсної рідини досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Титр інфекційної активності вірусу розраховували за методом Ріда і Менча.

Результати й обговорення. Здатність вакцинних штамів зберігати інфекційну активність в основному залежить від рецептури середовища висушування, що захищає вірус у процесі ліофілізації.

На першому етапі було виготовлено 8 дослідних зразків зі штаму Н-120 з використанням різних рецептур середовища:

Стабілізатор №1 на основі пептону ферментативного;

Стабілізатор №2 на основі пептону бактеріологічного;

Стабілізатор №3 на основі L-Аргініну;

Стабілізатор №4 на основі L-Аргінін гідрохлориду;

Стабілізатор №5 на основі гідролізату казеїну та гідролізованого желатину;

Стабілізатор №6 на основі L-Аргінін гідрохлориду та полівінілпіролідону (ПВП);

Стабілізатор №7 на основі гідролізованого желатину, пептону ферментативного та сорбітолу;

Стабілізатор №8 на основі гідролізованого желатину, пептону ферментативного та сахарози.

Оцінювали якість ліофілізату, його розчинність та втрату в масі при висушуванні (табл. 1), а також вплив стабілізаторів на збереження інфекційної активності вірусу ІБК при

ліофілізації (втрата інфекційної активності в процесі ліофілізації) та в умовах прискореного старіння (табл. 2).

Таблиця 1

Оцінка якості дослідних зразків ліофілізату зі штаму Н-120 (n=100)

№ зразка	«підвали»	тріщини	Сколи	зменшення діаметру таблетки	розломана таблетка	Розчинність, сек		Втрата в масі, %
						500 мл	5 мл	
1	100	7	100	100	0	2	0	1,9
2	100	30	100	100	0	0 сек. При розчиненні спостерігалися часточки, що розчинилися при перемішуванні	0	2,4
3	100	12	100	30	0	5 сек. При розчиненні спостерігалися часточки, що розчинилися при перемішуванні	2	3,1
4	100	10	35	53	0	0 сек	0	3,1
5	100 незначні	0	0	0	0	0 сек	0	2,0
6	100	0	0	10	0	3 сек. При розчиненні спостерігалися часточки, що розчинилися при перемішуванні	0	2,8
7	100 незначні	0	0	87	0	0 сек	0	3,4
8	87	0	0	100	0	0 сек	0	1,9

При візуальній оцінці якості ліофілізату критичних відхилень не виявлено у жодному зразку. У всіх зразках були відсутні розломи, хороша або відмінна розчинність ліофілізату у різному об'ємі води. У зразках 5-8 були відсутні тріщини і сколи. Наявність гідролізованого желатину позитивно впливає на характер формування ліофілізату. Так звані «підвали» і зменшення діаметра таблетки були в допустимих межах у всіх зразків. Втрата в масі при висушуванні була в межах 1,9 - 3,4 %.

Таким чином, оцінюючи якість ліофілізату і втрату в масі при висушуванні для ліофілізації допустиме використання кожного варіанту стабілізатора.

Таблиця 2

Титр інфекційної активності вірусу ІБК, штаму Н-120 у дослідних зразках після ліофілізації і в умовах прискореного старіння

Стабілізатор	Титр АГ, Ig EID ₅₀ /мл	Розрахунковий титр на флакон, Ig EID ₅₀ /фл	Падіння титру інфекційної після ліофілізації, Ig EID ₅₀ /фл	Інфекційна активність вірусу ІБК у дослідних зразках, Ig EID ₅₀ /фл		
				Після ліофілізації	Зберігання 3 доби при 37 °С	Зберігання 5 діб при 37 °С
1	8,0	8,1	0,0	8,1	6,85±0,35	6,0
2			-1,6	7,3±0,1	5,7±0,5	н/д
3			-0,27	7,85±0,35	6,75±0,25	6,65±0,25
4			0,0	8,1±0,1	6,85±0,25	6,95±0,25
5			-1,1	7,0	5,35±0,35	н/д
6			-0,3	7,8±0,4	7,1±0,1	6,75±0,25
7			0,0	8,1±0,1	6,65±0,25	6,45±0,05
8			-0,5	7,6±0,1	6,55±0,15	6,45±0,25

Примітка: *н/д - не досліджували

При визначенні титру інфекційної активності встановлено критичне падіння титру після ліофілізації у дослідних зразках №2 та №5, що становить 1,6 та 1,1 lg ЕІД₅₀/фл відповідно. В умовах прискореного старіння 3 доби зберігання при 37 °С титр інфекційної активності знизився на 1,6 та 1,65 lg ЕІД₅₀/фл, тому проведення подальших дослідження зразків було недоцільним.

Було встановлено, що втрата при ліофілізації ІА вірусу ІБК у зразку №1, істотно нижча ніж у зразку №2 і становить 0,9 lg ЕІД₅₀/фл. При прискореному старінні також зразок №1 показав кращі результати в порівнянні зі зразком №2 на 0,3 lg ЕІД₅₀/фл. Таким чином, використання пептону бактеріологічного є недоцільним порівняно з ферментативним.

За показником «падіння титру інфекційної після ліофілізації» кращі результати були отримані на середовищах висушування № 1, 3, 4, 6, 7, 8. Інфекційна активність вірусу після ліофілізації була в межах 7,6-8,1 lg ЕІД₅₀/фл. З них, у зразках № 1, 4, 7 падіння титру інфекційної активності після ліофілізації було відсутнім. Аналізуючи зразки №7 та №8 наявність сорбітолу у складі середовища володіє кращими протективними властивостями у процесі ліофілізації, порівняно із сахарозою.

В умовах зберігання 3 доби при 37 °С кращі результати були отримані на стабілізаторах № 1, 3, 4, 6, 7 і 8. Інфекційна активність вірусу ІБК, штаму Н-120 була в межах 6,65 – 7,1 lg ЕІД₅₀/фл.

В умовах зберігання 5 діб при 37°С задовільні результати були отримані на стабілізаторах № 1, 3, 4, 6, 7, 8. Інфекційна активність вірусу ІБК, штаму Н-120 була в межах 6,0 – 6,95 lg ЕІД₅₀/фл.

Відсутні принципові відмінності у зразках №3 і №4 на основі L-Аргініну та L-Аргініну гідрохлориду.

У результаті досліджень та враховуючи технологічні особливості приготування, були обрані два стабілізатори №1 і №6, як найбільш перспективні для подальших досліджень.

Для набору статистичних даних, провели додатковий дослід з використанням обох стабілізаторів при виготовленні дослідних зразків ліофілізату на основі штаму Н-120. Після ліофілізації зразків вивчили їх стабільність при температурі 37°С (прискорене старіння протягом 5 діб) і 2-8 °С.

Титри ІА зразків ліофілізованих на стабілізаторі №1 і 6 відразу після ліофілізації були в межах 8,0-8,2 lg ЕІД₅₀/фл. При прискореному старінні титри в зразках знизилися до 6,05 - 6,5 lg ЕІД₅₀/фл (табл. 3), при цьому падіння ІА в першому зразку склалось близько 2,15 lg ЕІД₅₀/фл, а в другому - 1,5 lg ЕІД₅₀/фл.

Отримані дані практично повторюють результати першого етапу досліджень.

Таблиця 3

Титр інфекційної активності вірусу ІБК, штаму Н-120 у дослідних зразках після ліофілізації і в умовах прискореного старіння

Стабілізатор	Титр АГ, lg ЕІД ₅₀ /мл	Розрахунковий титр на флакон, lg ЕІД ₅₀ /фл	Падіння титру інфекційної після ліофілізації, lg ЕІД ₅₀ /фл	Інфекційна активність вірусу ІБК у дослідних зразках, lg ЕІД ₅₀ /фл	
				Після ліофілізації	Зберігання 5 діб при 37 °С
1	8,2	8,3	-0,1	8,2	6,05±0,15
6			-0,3	8,0±0,1	6,5±0,25

Вплив середовищ висушування №1 і №6 на стабільність вірусу інфекційного бронхіту курей було в подальшому досліджено з використанням штаму Var2/V2.

Для цього визначали ІА вірусу ІБК, штаму Var2/V2 у зразках відразу після їх ліофілізації, після зберігання при температурі 37°С протягом 5 діб і при 2-8 °С через 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 27 місяців.

У результаті було встановлено, що втрата ІА відразу після ліофілізації в зразках зі стабілізаторами №1 і 6 була приблизно однаковою і становила 0,5-0,55 lg ЕІД₅₀/фл (табл. 4).

Втрата при прискореному старінні становила 0,15-0,2 lg ЕІД₅₀/фл. Під час зберігання зразків при температурі 2-8°C через 1, 2, 3, 6, 9, 12 місяців титр ІА вірусу ІБК, штаму Var2/V2 у зразках залишався в межах 6,95-7,1 lg ЕІД₅₀/фл. Через 18, 24 і 27 місяців титр інфекційної активності становив 6,65, 6,75 і 6,7 lg ЕІД₅₀/фл, відповідно (табл. 5).

Таблиця 4

Результати визначення титру інфекційної активності вірусу ІБК, штаму Var2/V2 у дослідних зразках після ліофілізації і в умовах прискореного старіння

№ зразка	Стабілізатор	Титр АГ, lg ЕІД ₅₀ /мл	Розрахунковий титр на флакон, lg ЕІД ₅₀ /фл	Падіння титру інфекційної після ліофілізації, lg ЕІД ₅₀ /фл	Інфекційна активність вірусу ІБК у дослідних зразках, lg ЕІД ₅₀ /фл	
					Після ліофілізації	Зберігання 5 діб при 37 °С
1	1	7,7	7,8	-0,5	7,3 ±0,4	7,1±0,1
2	6			-0,55	7,25±0,05	7,1±0,1

Таблиця 5

Дослідження стабільності дослідних зразків препарату POLIMUN IB VAR2

Тривалість зберігання, міс	Інфекційна активність вірусу ІБК у дослідних зразках, lg ЕІД ₅₀ /фл	
	Зразок №1	Зразок №2
1	7,1±0,1	7,1±0,1
2	7,03±0,1	7,28±0,08
3	7,2	7,2
6	7,03±0,1	6,75±0,25
9	6,95±0,25	7,0
12	6,95±0,25	7,1±0,1
18	6,65±0,25	6,75±0,25
24	6,75±0,25	6,45±0,05
27	6,7±0,05	6,95±0,25

Таким чином, стабілізатори №1 і №6 забезпечили збереження вірусу ІБК штаму Var2/V2 при 2-8 °С протягом 24 місяців. Вміст вірусу у зразках протягом всього терміну зберігання відповідав мінімум 1000 доз у флаконі.

ВИСНОВКИ

При проведенні досліджень підібрано оптимальні рецептури середовищ висушування. Використання стабілізаторів №1 і №6 для ліофілізації вакцин проти інфекційного бронхіту курей зі штамів Н-120 і Var2/V2 дозволило отримати стабільні протягом 24 місяців препарати. Отримано високоякісний ліофілізат, що добре розчиняється у воді та має залишкову вологість в межах 1,9 - 3,4 %. Наявність сорбітолу у складі середовища володіє кращими протективними властивостями у процесі ліофілізації, порівняно із сахарозою. Встановлено позитивний вплив гідролізованого желатину у складі середовища висушування на характер формування ліофілізату.

Перспективи досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення та забезпечення стабільності різних штамів вірусу інфекційного бронхіту курей при промисловому виробництві та розробці імунобіологічних препаратів.

References

- Cardoso, F.M.C., Petrovajová, D., & Horňáková, T. (2017). Viral vaccine stabilizers: status and trends. *Acta virologica*, 61(3), 231-239. https://doi.org/10.4149/av_2017_301
- Jackwood, M.W., & De Wit, S. (2020). Infectious bronchitis. *Diseases of poultry*, 167-188. <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch4>
- Kamau, N.A., Lee, D.W., Kheong, C.K., Park, J.E., & Shin, H.J. (2010). Effect of Vac-Pac Plus on the viability of a live infectious bronchitis vaccine. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2), 152-156. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00096>
- Keep, S., Stevenson-Leggett, P., Steyn, A., Oade, M. S., Webb, I., Stuart, J., & Bickerton, E. (2020). Temperature sensitivity: A potential method for the generation of vaccines against the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses*, 12(7), 754. <https://doi.org/10.3390/v12070754>
- Kristensen, D., Chen, D., & Cummings, R. (2011). Vaccine stabilization: research, commercialization, and potential impact. *Vaccine*, 29(41), 7122-7124.
- Otsuki, K., Yamamoto, H., & Tsubokura, M. (1979). Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). *Archives of virology*, 60(1), 25-32. <https://doi.org/10.1007/bf01348027>
- Pishraft-Sabet, L., Masoudi, S., & Hoseini-Vafa, N. (2015). Evaluation of various chemical stabilizers on the stability of avian infectious bronchitis vaccine. *Veterinary Researches & Biological Products*, 28(4), 52-59. [10.22092/VJ.2015.103031](https://doi.org/10.22092/VJ.2015.103031) <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.070>