

## Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

С. С. Курашова<sup>1</sup>, А. А. Ишмухаметов<sup>1,2</sup>, М. С. Егорова<sup>1</sup>, М. В. Баловнева<sup>1</sup>,  
Т. К. Дзагурова<sup>1</sup>, Е. А. Ткаченко<sup>1,2</sup>

DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», Москва

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России

### Резюме

Представлены результаты применения различных способов инактивирования вируса Пуумала, включая ультрафиолетовые лучи (УФ), β-пропиолактон (БПЛ) и формалин. Иммуногенность вакцинных препаратов, полученных с использованием этих способов инактивирования вируса, не имела достоверных отличий в опытах на мышах BALB/c. Существенным преимуществом УФ и БПЛ по сравнению с формальдегидом является короткое время инактивирования вируса.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вирус, вакцина, инаktivация, формалин, бета-пропиолактон, УФ-лучи, ПЦР в режиме реального времени

Для цитирования: Курашова С. С., Ишмухаметов А. А., Егорова М. С. и др. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018; 17 (4): 26–29. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29

### Comparative Characteristics of Inactivation Agents for HFRS Vaccine Development

C. C. Kurashova<sup>1</sup>, A. A. Ishmukhametov<sup>1,2</sup>, M. S. Egorova<sup>1</sup>, M. V. Balovneva<sup>1</sup>, T. K. Dzagurova<sup>1</sup>, E. A. Tkachenko<sup>1,2</sup>

DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29

<sup>1</sup>Federal State Budget Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», Moscow

<sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

### Abstract

The results of various methods of Puumala virus inactivation, including ultraviolet rays (UV), β-propiolactone (BPL) and formalin are presented. Immunogenicity of vaccine preparations obtained using these virus inactivation methods did not differ significantly in the experiments on BALB/c mice. Essential advantage of UV and BPL in relation to formaldehyde is the short time of virus inactivation.

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), virus, vaccine, inactivation, formalin, β-propiolactone, UV rays, real-time PCR

For citation: Kurashova C. C., Ishmukhametov A. A., Egorova M. C. et al. Comparative Characteristics of Inactivation Agents for HFRS Vaccine Development. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018; 17 (4): 26–29. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29

### Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространенный в Евразии, занимающий в России одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека [1]. Более 95% заболеваемости ГЛПС в РФ ассоциировано с вирусом Пуумала, остальные случаи, регистрируемые на европейской территории, вызываются двумя подтипами Куркино и Сочи хантавируса Добrava/Белград, на Дальнем Востоке – вирусами Хантаан, Амур и Сеул. До сих пор не существует эффективных методов лечения хантавирусных инфекций, которые были бы направлены на элиминацию

возбудителя. Наиболее действенным методом борьбы с ГЛПС могла бы стать вакцинопрофилактика. Важным условием эффективности вакцин является выбор инактиватора и оптимальных условий инаktivации, позволяющих лишить вирус инфекционности при максимальном сохранении его иммуногенных свойств.

Для инаktivации вирусов используют различные физические и химические методы. Из физических методов наиболее распространенными являются: γ-лучи [2, 3], УФ-лучи [4], воздействие температуры [5]. В практике создания инаktivированных вакцин в течение десятилетий наиболее широко применяются такие химические инаktivаторы

как формальдегид и  $\beta$ -пропионлактон (БПЛ), которые используются при производстве лицензированных вирусных вакцин [6]. Выбор способа инактивации основывается на механизме действия инактиватора и свойствах инактивируемого вируса.

Наиболее общепринятым инактивирующим агентом является формальдегид. Для термоллабильных хантавирусов с целью сохранения максимальной антигенной активности было предложено использовать схему инактивации, которая включает экспозицию вирусосодержащего субстрата при температуре  $6 \pm 2$  °C в присутствии 0,025% раствора формалина в течение 30 суток. Несмотря на ряд преимуществ, этот метод не вполне технологичен, и в ряде случаев для полной уверенности в инактивации требуется дополнительно не менее 30 суток [7].

**Цель работы** – выбор наиболее безопасного и технологичного метода инактивации хантавирусов на примере вируса Пуумала.

### Материалы и методы

Вакцинный материал был получен на основе штамма PUU-TKD-VERO вируса Пуумала (ПУУ) по ранее описанной технологии [8].

Процесс получения вакцины включает: репродуцирование вируса в культуре клеток, сбор вирусосодержащего субстрата, концентрирование, хроматографическую очистку, инактивирование, сорбцию инактивированного вируса на гидроокиси алюминия. Были испытаны вакцинные препараты, инактивированные различными способами: А препарат – УФ (расстояние от лампы до емкости с вирусосодержащим препаратом 24 см, высота слоя инактивируемого препарата – 2 см);

Б препарат – БПЛ в концентрации 1:4000 при температуре  $6 \pm 2$  °C; В препарат – формалин в концентрации 1:4000 при  $t = 6 \pm 2$  °C.

Вакцинные препараты вводили в/м взрослым (20–25 г) мышам BALB/c по 0,5 мл в мышечную ткань бедра. Для каждого варианта использовали по 7 мышей. Иммунизировали мышей по схеме: 3 иммунизации с двухнедельным интервалом, забор крови через 2 недели после последней иммунизации. Кровь забирали тотально. Каждая проба сыворотки крови трехкратно исследована в реакции нейтрализации в культуре клеток Vero-E6. Результат представлен в виде среднегеометрического значения титров антител по 50% редукции числа ФОЕ. Для количественной оценки РНК в вакцинном материале использовали ПЦР в режиме реального времени со штаммоспецифичными праймерами Ufa F\_R, и зондом Ufa Z.

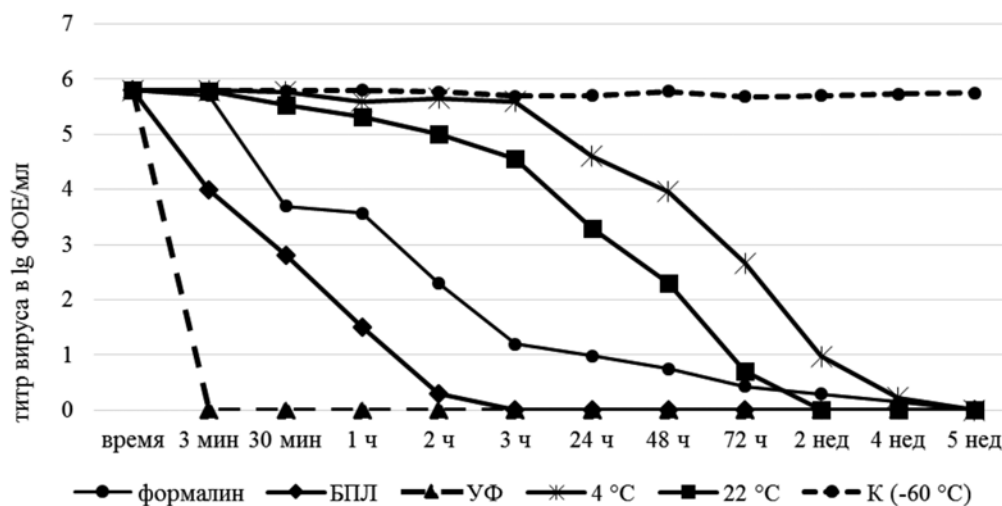
### Результаты и обсуждение

В результате изучения кинетики инактивации вакцинных препаратов было показано (рис. 1), что вирус Пуумала с исходным титром 5,8 lg ФОЕ/мл инактивировался: А – при облучении УФ – в течение 3 минут; Б – при использовании БПЛ при  $6 \pm 2$  °C – в течение 1 часа; В – в присутствии формалина (0,025%) при  $6 \pm 2$  °C – в течение 30 суток.

Вирус полностью инактивировался при 22 °C в течение 2-х недель, при  $6 \pm 2$  °C через 30 суток. Таким образом, при температуре  $6 \pm 2$  °C время инактивации вируса в присутствии 0,025% формалина практически совпадает с таковым в результате термоинактивации.

При введении мышам BALB/c испытуемых вакцинных препаратов (А, Б, В) каких-либо побочных

**Рисунок 1.**  
**Динамика инактивации вируса Пуумала**  
*Dynamics of Inactivation of the Puumala Virus*



**Таблица 1.**  
**Содержание РНК в вакцинном материале после инактивации**  
*RNA Content in the Vaccine Material after Inactivation*

Штамм Strain	Способ инактивации Inactivation Method	Значение $C_t^*$
PUU-TKD-VERO	УФ ultraviolet, 3 мин minutes	23
	БПЛ $\beta$ -propionylactone, 3 часа hours ( $6 \pm 2^\circ\text{C}$ )	25
	Формалин Formalin, 30 x twenty-four hours суток ( $6 \pm 2^\circ\text{C}$ )	26
	$+22^\circ\text{C}$ – 2 недели weeks	26
	$6 \pm 2^\circ\text{C}$ – 4 недели weeks	23
	К – (без инактивации, without inactivation)	21

\* Значение порогового цикла  
Threshold cycle value

эффектов, как местного, так и общего характера не наблюдалось. Среднегеометрическое титров нейтрализующих антител в ответ на введение вакцинных препаратов составили: А (УФ) –  $7,41 \pm 0,03$ ; Б (БПЛ) –  $8,17 \pm 0,01$ ; В (формалин) –  $7,93 \pm 0,16$ .

По результатам ПЦР в режиме реального времени не было выявлено существенной разницы между образцами вирусных препаратов, инактивированных разными способами (табл. 1).

Поскольку БПЛ в первую очередь взаимодействует с ДНК или РНК, предполагается, что иммуногенные эпитопы белка будут незначительно повреждены, в отличие от инактивирования формальдегидом [9–11]. Другим важным преимуществом БПЛ по сравнению с формалином является его способность гидролизироваться в водных растворах из-за быстрого гидролиза, который позволяет ему реагировать с гидроксильными, аминокислотными, сульфгидрильными и фенольными группами в течение нескольких часов с образованием не токсичных, не канцерогенных продуктов [12]. Избыточный БПЛ можно нейтрализовать добавлением тиосульфата [13]. Важным моментом эксперимента является то, что значение порогового цикла  $C_t$  при постановке ПЦР в режиме реального времени не выявило отличий инактивированных препаратов от контрольного нативного образца.

## Выводы

1. Применение вакцинных препаратов вируса Пуумала, инактивированных различными способами: А – УФ, Б – БПЛ, В – формалином, не выявило статистически достоверных различий в их иммуногенности, несмотря на более высокие титры нейтрализующих антител после иммунизации вакциной Б.
2. Наиболее перспективными являются инактиваторы: УФ и БПЛ по сравнению с формалином, поскольку имеют ряд преимуществ: время инактивации значительно короче, в меньшей степени повреждаются белки.
3. Результаты свидетельствуют о том, что вероятное функциональное изменение геномного материала, в частности при использовании УФ и БПЛ [6] не влияет на выявление вирусной РНК вируса Пуумала с помощью видоспецифичных праймеров.

Несмотря на очевидные преимущества УФ и БПЛ, в настоящее время формальдегид более широко используется для инактивации патогенов, возможно, из-за исторического многолетнего опыта использования его, что упрощает пути для лицензирования вакцин. Тем не менее, как показал эксперимент, УФ и БПЛ можно рассматривать в качестве доступных, более технологичных и безопасных методов инактивации, в частности, в производстве инактивированных хантавирусных вакцин.

## Литература

1. Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А. А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России: успехи и актуальные проблемы на современном этапе. Биомедицина XXI века: достижения и перспективные направления развития. Сборник научных трудов. 2016; 331–344.
2. Martin, S. S., Bakken, R. R., Lind, C. M., Garcia, P., Jenkins, E., Glass, P. J., & Fine, D. L. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB. Vaccine. 2010; 28 (4): 1031–1040.
3. Alsharif M., Müllbacher A. The  $\gamma$ -irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general //Immunology and cell biology. 2010; 88 (2): 103–105.
4. Budowsky, E. I., Kostyuk, G. V., Kost, A. A., & Savin, F. A. Principles of selective inactivation of viral genome. Archives of virology. 198; 68 (3): 239–247.
5. Nims R. W., Plavsic M. Polyomavirus inactivation—a review //Biologicals. 2013; 41(2): 63–70.
6. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines //Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. Berlin, Heidelberg; Springer, 2015; 45–80.
7. Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К., Синюгина А. А., Коротина Н. А., Набатников П. А. и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Ремедиум. 2015; 6: 47–53.
8. Бархалева О. А., Воробьева М. С., Ладыженская И. П., Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Биопрепараты. 2011; 1: 27–30.

9. Colburn N. H., Richardson R. G., Boutwell R. K. Studies of the reaction of  $\beta$ -propiolactone with deoxyguanosine and related compounds. *Biochemical pharmacology*. 1965; 14 (7): 1113–1118.
10. Maté U., Solomon J. J., Segal A. In vitro binding of  $\beta$ -propiolactone to calf thymus DNA and mouse liver DNA to form 1-(2-carboxyethyl) adenine. *Chemico-biological interactions*. 1977; 18 (3): 327–336.
11. Roberts J. J., Warwick G. P. The reaction of  $\beta$ -propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA. *Biochemical pharmacology*. 1963; 12 (12): 1441–1442.
12. Hartman F. W., LoGrippe G. A. Beta-propiolactone in sterilization of vaccines, tissue grafts, and plasma. *Journal of the American Medical Association*. 1957; 164 (3): 258–260.
13. Lawrence S. A. beta-Propiolactone: viral inactivation in vaccines and plasma products. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*. 2000; 54 (3): 209–214.

## References

1. Tkachenko E. A., Dzagurova T. K., Ishmukhametov A. A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia: successes and actual problems at the present stage. *Biomedicine of the XXI century: achievements and perspective directions of development. Collection of scientific papers*. 2016; 331–344 (in Russian).
2. Martin, S. S., Bakken, R. R., Lind, C. M., Garcia, P., Jenkins, E., Glass, P. J., Fine, D. L. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB. *Vaccine*. 2010; 28 (4): 1031–1040.
3. Alsharif M., Müllbacher A. The  $\gamma$ -irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general // *Immunology and cell biology*. 2010; 88 (2): 103–105.
4. Budowsky, E. I., Kostyuk, G. V., Kost, A. A., Savin, F. A. Principles of selective inactivation of viral genome. *Archives of virology*. 198; 68 (3): 239–247.
5. Nims R. W., Plavsky M. Polyomavirus inactivation – a review. *Biologicals*. 2013; 41 (2): 63–70.
6. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines // *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015; 45–80.
7. Tkachenko E. A., Ishmukhametov A. A., Dzagurova T. K., Sinugina A. A., Korotina N. A., Nabatnikov P. A. et al. Manufacturing techniques and methods of control inactivated Vero cells-derived vaccine against HFRS developed in Russia. *Remedium*. 2015; 6: 47–53 (in Russian).
8. Barkhaleva O. A., Vorobyeva M. S., Ladizhenskaya I. P., Tkachenko E. A., Dzagurova T. K. Vaccine against hemorrhagic fever with kidney syndrome. *Biopreparations*. 2011; 1: 27–30 (in Russian).
9. Colburn N. H., Richardson R. G., Boutwell R. K. Studies of the reaction of  $\beta$ -propiolactone with deoxyguanosine and related compounds. *Biochemical pharmacology*. 1965; 14 (7): 1113–1118.
10. Maté U., Solomon J. J., Segal A. In vitro binding of  $\beta$ -propiolactone to calf thymus DNA and mouse liver DNA to form 1-(2-carboxyethyl) adenine. *Chemico-biological interactions*. 1977; 18 (3): 327–336.
11. Roberts J. J., Warwick G. P. The reaction of  $\beta$ -propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA. *Biochemical pharmacology*. 1963; 12 (12): 1441–1442.
12. Hartman F. W., LoGrippe G. A. Beta-propiolactone in sterilization of vaccines, tissue grafts, and plasma // *Journal of the American Medical Association*. 1957; 164 (3): 258–260.
13. Lawrence S. A.  $\beta$ -Propiolactone: viral inactivation in vaccines and plasma products. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*. 2000; 54 (3): 209–214.

## Об авторах

- **Айдар Айратович Ишмухаметов** – д. м. н., профессор, генеральный директор ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН».
- **Евгений Александрович Ткаченко** – д. м. н., профессор, руководитель института ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН». +7985 784 30 50; evgeniytkach@mail.ru.

## About the Authors

- **Aidar I. Ishmukhametov** – Dr. Sci. (Med.), Professor, General Director of «Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Preparations named after M. P. Chumakov Institute».
- **Evgeny A. Tkachenko** – Dr. Sci. (Med.), professor, leader of of «Federal Research Center for Research and Development of Immunobiological Preparations named after M. P. Chumakov Institute». +7985 784 30 50; evgeniytkach@mail.ru.

## ИНФОРМАЦИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

### О ситуации по гриппу птиц

По данным Всемирной организации здоровья животных (OIE) отмечено, что с 2013 г. наблюдается вторая панэпизоотическая волна гриппа птиц. По итогам 2017 г. зарегистрировано 2840 очагов этой инфекции в 61-й стране мира, в том числе во Франции (447 очагов), Южной Кореи (445 очагов), Тайване (205 очагов), Германии (194 очага), Италии (95 очагов).

Ситуацию осложняет циркуляция различных подтипов вируса, что затрудняет контроль и ликвидацию вспышек. В январе 2018 г. 8 стран (Афганистан, Камбоджа, Тайвань, Ирак, Япония, Южная Корея, Саудовская Аравия и Южная Африка) и два континента (Африка и Азия) были поражены вспышками среди домашней птицы. По состоянию на 01.06.2018 только на приграничных с Россией территориях зарегистрировано более 80 очагов этой инфекции, в том числе в Японии и Южной Кореи (по 14 очагов, в Тайване – 73, Китае – 5).

По сравнению с первой волной (с 2005 по 2012 гг.) развивающаяся в настоящее время ситуация отмечена утроением числа циркулирующих подтипов вируса гриппа птиц (12 против 4). Текущей панэпизоотией охвачены все континенты. Погибло около 120 млн голов птицы. В 68 стра-

нах отмечена хотя бы одна вспышка гриппа птиц. Такие штаммы, как H5N1, H5N2 и H5N8 сегодня являются обычными для этих стран. Ни в одном из этих случаев запрета на употребление мяса птицы и птицепродуктов не вводилось.

В мае–июне 2018 г. в Российской Федерации случаи гриппа птиц наблюдались в 5-ти регионах страны, преимущественно в личных подсобных хозяйствах. Случаев птичьего гриппа среди людей не зарегистрировано.

В каждом случае Роспотребнадзором немедленно организуется проведение комплекса мер с целью предупреждения возможности преодоления межвидового барьера между птицей и человеком. Весь объем лабораторных исследований проводится Государственным научным центром вирусных биотехнологий «Вектор» Роспотребнадзора. Никаких изменений вируса, несущих риски для здоровья человека на сегодняшний день не выявлено. Ситуация по гриппу птиц в Российской Федерации не представляет угрозы здоровью населения.

Источник: [http://rospotrebнадzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT\\_ID=10289](http://rospotrebнадzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT_ID=10289)