

Научная статья
УДК 636.03; 636.082; 636.5.034; 578; 615.371
doi: 10.28983/asj.y2023i5pp67-71

**Определение параметров куриных эмбрионов, используемых
в производстве инактивированных противогриппозных вакцин**

Павел Евгеньевич Вандышев

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева,
г. Рязань, Россия, e-mail: finn10@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты определения параметров куриных эмбрионов для получения инактивированных гриппозных вакцин. Исследования проводились в ООО «Форт» (Рязанская область). Было использовано 8,736 млн куриных эмбрионов от кур яичных кроссов Родонит-3, Хайсекс браун. В ходе исследований выявлена зависимость развития куриного эмбриона от различных периодов роста. Установлено, что оптимальными параметрами для использования куриных эмбрионов в производстве противогриппозных вакцин являются продолжительность жизни 7–9 дней, масса эмбриона 2–3 г, высокий выход гемагглютинаина (до 70 %) по сравнению с другими группами выборки ($P < 0,001$). Показано, что увеличение аллантаической жидкости во многом зависит от применяемых в производстве систем очистки. Наиболее оптимальным методом очистки является тангенциальная система фильтрации, обеспечивающая высокую чистоту субстрата, полученного с использованием куриных эмбрионов.

Ключевые слова: куриные эмбрионы; производство инактивированных противогриппозных вакцин; масса; срок жизни; аллантаическая жидкость.

Для цитирования: Вандышев П. Е. Определение параметров куриных эмбрионов, используемых в производстве инактивированных противогриппозных вакцин // Аграрный научный журнал. 2023. № 5. С. 67–71. [http: 10.28983/asj.y2023i5pp67-71](http://10.28983/asj.y2023i5pp67-71).

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

Determination of parameters of chick embryos used in the production of inactivated influenza vaccines

Pavel E. Vandyshv

Federal State Educational Institution of Higher Education Ryazan State Agrotechnological University, Ryazan,
Russia, e-mail: finn10@yandex.ru

Abstract. The results of determining the parameters of chicken embryos for obtaining inactivated influenza vaccines are presented. The studies were carried out at LLC "Fort" (Ryazan region). 8.736 million chicken embryos were used from chickens of egg crosses Rhodonit-3, Hisex brown. In the course of the research, the dependence of the development of a chicken embryo on various growth periods was revealed. It has been established that the optimal parameters for the use of chicken embryos in the production of influenza vaccines are the life span of 7–9 days, the weight of the embryo is 2–3 g. high yield of hemagglutinin (up to 70 %) compared to other groups of the sample ($P < 0.001$). It has been shown that the increase in allantoic fluid largely depends on the purification systems used in production. The most optimal cleaning method is a tangential filtration system, which ensures high purity of the substrate obtained using chick embryos.

Keywords: chicken embryos; production of inactivated influenza vaccines; weight; life span; allantoic fluid.

For citation: Vandyshv P. E. Determination of parameters of chick embryos used in the production of inactivated influenza vaccines. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = The Agrarian Scientific Journal. 2023;(5): 67–71. (In Russ.). [http: 10.28983/asj.y2023i5pp67-71](http://10.28983/asj.y2023i5pp67-71).

Введение. Технология производства противогриппозных вакцин с использованием куриных эмбрионов является наиболее доступной и имеет широкое применение в целях защиты населения от распространения сезонной гриппозной инфекции [4, 5, 9]. Она включает в себя ряд операций, которые должны строго соблюдаться. Прежде всего, это получение рабочего посевного материала. После объявления Всемирной организацией здравоохранения штаммового состава для





Северного полушария каждому предприятию, осуществляющему производство противогриппозных вакцин, предоставляется высокопродуктивный реассортант каждого типа вируса гриппа. Используя реассортант, производится пассирование вируса на куриных эмбрионах. Период – до 3 суток, количество пассажей – от 4 до 6 [10,11].

Необходимыми звеньями технологической цепочки производства вакцины являются приемка куриных эмбрионов, подготовка их к использованию, дополнительная инкубация, овоскопирование, инокуляция, сепарация ВАЖ, микрофльтрация, ультрафльтрация и концентрирование, получение моновалентов вакцин, получение готовой лекарственной формы.

Одним из важных факторов, влияющих на технологию производства противогриппозных вакцин, является качество применяемого сырья – куриного эмбриона. От этого зависит объем производимого активного агента – гемагглютинина. Нарботка вирусодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) зависит от особенностей куриных эмбрионов [3, 6, 7], подбора параметров, обеспечивающих получение максимального объема аллантоисной жидкости для инкубации вируса гриппа и ее последующей очистки от побочных белков и иных примесей. Куриный эмбрион, обладающий устойчивым развитием, должен обеспечить достаточный уровень выживаемости при транспортировке до места производства, а также выживаемости при получении иммунобиологической нагрузки при инокуляции вируса [1, 2].

Производство противогриппозных вакцин предполагает два основных процесса: наработку вирусодержащей жидкости и очистку от примесей. Количественный анализ выхода гемагглютинина определяется на конечных стадиях методом Орид, при этом контроль эффективности осуществляется посредством анализа общего белка. [8] Стадия очистки вирусодержащей жидкости предполагает проведение комплекса операций, обеспечивающих последовательное избавление от примесей и сохранение действующего агента (гемагглютинина) в субстрате. Объем выхода на стадиях очистки может составлять от 50 до 70 % по основному белку. Онтогенез развития куриного эмбриона влияет на появление примесей и побочных белков, что, в свою очередь, определяет применение куриного эмбриона в зависимости от его возраста.

Цель данной работы – определение параметров куриных эмбрионов (кроссы Родонит-3, Хайсекс браун), используемых в производстве противогриппозных вакцин.

Методика исследований. Исследования по определению наиболее оптимальных параметров куриных эмбрионов (КЭ) в производстве противогриппозных вакцин проводили в ООО «Форт» (Рязанская обл.). Определение параметров технологических процессов и использование исходного сырья осуществляли в соответствии со стандартами предприятия и методиками, соответствующими Государственной Фармакопее РФ.

В исследовании использовано 8,736 млн куриных эмбрионов. Их получали от кур яичных кроссов Родонит -3, Хайсекс браун, по 3 поставки, не менее 145 тыс. В производстве использовали КЭ каждого кросса в заданном параметре развития (масса эмбриона) – от 0,5 до 6 г. Доведение куриных эмбрионов до необходимых параметров осуществляли путем корреляции периода инкубации на предприятии-производителе, затем на стадии релаксации.

Результаты исследований. На основании полученных результатов устанавливали зависимость развития куриного эмбриона от различных сроков роста для использования его в процессе производства противогриппозных вакцин. Оценку КЭ проводили по следующим параметрам: возможность использования на стадии заражения (инокуляции); возможность использования на стадии сбора аллантоисной жидкости; процент гибели в процессе производства; объем собираемой аллантоисной жидкости; внешний вид аллантоисной жидкости; прогнозный выход гемагглютинина (ГА) на стадии очистки.

В ходе исследования была дана характеристика поставляемых куриных эмбрионов в зависимости от массы извлекаемого зародыша. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Достоверность полученных результатов определяли посредством статистических показателей для малых выборок. Результаты обработки данных представлены в табл. 2.

При использовании эмбрионов, достигших массы 2–2,5 и 2,5–3 г, отмечали наиболее высокий выход гемагглютинина (до 70 %) по сравнению остальными группами выборки при достижении коэффициента изменчивости ($Cv\%$) 0,61 и 0,56 % соответственно, что достоверно выше ($P < 0,001$).

Параметры куриных эмбрионов при использовании в производстве противогриппозных вакцин

Масса эмбриона, г	Характеристика эмбриона	Использование на стадии заражения	Использование на стадии инкубации вируса	Характеристика ВАЖ	Гибель эмбриона, % (приемка эмбриона, инкубация вируса)	Сбор ВАЖ, мл	Выход гемагглютинаина, %	Соответствие требованиям производства
0,5–1	Появление век, клюва	+	+	Светлая, полупрозрачная	До 60	до 4	20±1,5	Не соответствует
1–1,5	Появление репродуктивных органов	+	+	Светлая, мутная	До 40	до 7	30±1,7	Не соответствует
1,5–2	Формирование пальцев	+	+	Светлая, мутная	До 30	до 8	50±1,6	Не соответствует
2–2,5	Появление сосочков на голове	+	+	Насыщенная, мутная	До 20	до 9	70±1,7	Соответствует
2,5–3	Начало появления пушка	+	+	Насыщенная, мутная	До 15	до 10	70±1,6	Соответствует
3–3,5	Появление пушка на спине	+	+	Насыщенная, мутная	До 15	до 11	50±1,3	Не соответствует
3,5–4	Появление пушка на спине	–	+	Насыщенная, мутная, наличие примесей	До 15	до 12	40±1,5	Не соответствует
4–4,5	Тело обрастает пушком	–	+	Бурая, мутная, наличие примесей	До 15	до 12	40±1,4	Не соответствует
4,5–5	Тело обрастает пушком	–	+	Бурая, мутная, наличие примесей	До 15	до 12	30±1,7	Не соответствует
5,5–6	Появление ногтей	–	–	–	Не используется	Не используется	–	Не соответствует

Примечание: + использование в процессе; – неиспользование в процессе.

Результаты биометрической обработки данных

Масса эмбриона, г	Предполагаемый выход гемагглютинаина, %	Коэффициент изменчивости C_v %	Значение вероятности	Достоверность
0,5–1	20±1,5	0,51	0,00021	$P < 0,001$; достоверно
1–1,5	30±1,7	0,62	0,00065	$P < 0,001$; достоверно
1,5–2	50±1,6	0,58	0,00037	$P < 0,001$; достоверно
2–2,5	70±1,7	0,61	0,00065	$P < 0,001$; достоверно
2,5–3	70±1,6	0,56	0,00072	$P < 0,001$; достоверно
3–3,5	50±1,3	0,49	0,00063	$P < 0,001$; достоверно
3,5–4	40±1,5	0,52	0,00045	$P < 0,001$; достоверно
4–4,5	40±1,4	0,5	0,00078	$P < 0,001$; достоверно
4,5–5	30±1,7	0,62	0,00029	$P < 0,001$; достоверно



По данным табл. 1, использование 4–5-дневных куриных эмбрионов, при их массе 0,5–1,5 г, является нецелесообразным из-за высокого процента гибели при инокуляции (40–60 %). Кроме того, отмечался низкий выход аллантаоисной жидкости – 4–7 мл с одного куриного эмбриона. Данные показатели связаны с недостаточным развитием эмбриона, не способного обеспечить сохранение особенностей организма при заражении вирусом гриппа, что может привести как к резкому снижению выхода гемагглютинаина, так и к увеличению себестоимости противогриппозной вакцины.

Использование 6- и 10-дневных куриных эмбрионов (масса эмбриона 1,5–2 и 3–3,5 г соответственно) также не желательно, так как они имеют пограничные параметры, что отрицательно сказывается на выходе гемагглютинаина. Это связано с неспособностью в первом случае обеспечивать достаточный уровень выживаемости при получении иммунобиологической нагрузки (гибель эмбрионов до 20 %) и наличием примесей за счет начинающегося формирования перьевого покрова тела эмбриона (выход ГА не более 50 %).

В 11–12 дней куриные эмбрионы имеют массу 3,5–5 г. Их использование нецелесообразно из-за низкого выхода гемагглютинаина, не более 40 %. Снижение выхода целевого агента сопровождается резким увеличением количества примесей, получаемых в результате онтогенеза эмбриона, в существенной степени осложняющих процесс очистки вирусосодержащей жидкости.

Использование куриных эмбрионов в возрасте 13 дней и более (масса 5,5–6 г) не представляется возможным из-за уже сформировавшегося перьевого покрова, наличия ногтей и развития процессов жизнедеятельности организма, влияющего на количество дебрисных белков, появляющихся в аллантаоисной жидкости. При использовании КЭ в производстве в этом возрасте и при этой массе, учитывая стадию заражения и инкубацию вируса, параметры эмбриона на стадии сбора аллантаоисной жидкости будут соответствовать 16 дням жизни и 8,5–9 г, что приведет к затруднению извлечения ВАЖ и, как следствие, к низким количественным показателям.

Следует учесть, что существует высокая вероятность наличия эмбрионов нежелательных параметров в поставляемых партиях в связи с неоднородностью поголовья или сбора КЭ от птицы разного возраста.

Исследования эмбрионов кроссов Родонит-3 и Хайсекс браун показали, что оптимальными параметрами для использования куриных эмбрионов в производстве противогриппозных вакцин являются срок жизни 7–9 дней, масса эмбриона 2–3 г. Куриные эмбрионы с данными параметрами обладают достаточной устойчивостью к иммунобиологической нагрузке (гибель эмбрионов не превышает 15 %) и высоким выходом по основному агенту (гемагглютинаину), не менее 70 %. Это обусловлено низким количеством примесей и образованием дебрисных белков в процессе ингибирования вируса.

Основываясь на результаты эксперимента, необходимо отметить, что стремление производителя противогриппозных вакцин к увеличению получения аллантаоисной жидкости не всегда является оправданным, так как в значительной степени зависит от систем очистки, применяемых на производстве. Использование хроматографических систем очистки кратно увеличивает объем потерь гемагглютинаина при достижении избыточной чистоты субстрата, несмотря на достижение сбора ВАЖ 10 мл и более. Наиболее оптимальным методом очистки является система тангенсальной фильтрации, которая обеспечивает высокую чистоту субстрата, получаемого при использовании куриных эмбрионов, соответствующих массе 2–2,5 г (7 дней) и 2,5–3 г (9 дней).

Заключение. В ходе исследований эмбрионов кроссов Родонит-3 и Хайсекс браун установлены оптимальные параметры КЭ для использования в производстве противогриппозных вакцин: срок жизни 7–9 дней, масса эмбриона 2–3 г.

Внедрение методик по определению параметров КЭ и корреляции данных показателей с процессами инкубации в птицеводческих хозяйствах, осуществляющих производство куриных эмбрионов, позволит достигнуть оптимальных характеристик, необходимых для производства инактивированных вакцин.

Результаты исследований позволили осуществить корректировку технологического процесса производства противогриппозных вакцин, что в свою очередь позволило более чем на 20 % увеличить средний выход вирусосодержащей жидкости и осуществить полномасштабное внедрение методов очистки по типу тангенсальной фильтрации. Это нашло отражение в разработке способа производства четырехвалентной вакцины «Ультрикс квадри», соответствующей требованиям Всемирной организа-



ции здравоохранения, содержащей не менее 15 мкг гемагглютинаина каждого утвержденного штамма вируса гриппа (патент RU № 2754398 «Способ получения вакцины для профилактики гриппа»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. с. 1375645 А1 СССР, МПК С12М 3/00. Устройство для посева вируса гриппа в развивающиеся куриные эмбрионы / Г. Б. Карташов. № 4039823; заявитель Всесоюзный научно-исследовательский проектно-конструкторский институт прикладной биохимии; заявл. 19.03.1986; опубл. 23.02.1988.
2. А. с. 1458381 А1 СССР, МПК С12М 1/00. Устройство для извлечения аллантоисной жидкости из яиц с куриными эмбрионами / Г. Г. Бадер. № 4089916; заявл. 28.07.1986; опубл. 15.02.1989.
3. Бессарабов Б. Ф. Инкубация яиц с основами эмбриологии сельскохозяйственной птицы / Б. Ф. Бессарабов. М.: КолосС, 2006. 240 с.
4. Васильев Ю. М., Руднева И. А., Коптяева И. Б. Сравнительное размножение вирусов гриппа птиц в культуре клеток и куриных эмбрионах // Вопросы вирусологии. 2009. Т. 54. № 4. С. 18–24.
5. Васильев Ю. М. Оптимизация размножения вирусов гриппа птиц в различных субстратах и совершенствование инактивированных вакцин против вируса гриппа птиц: дис. ... канд. биол. наук; НИИ вакцин и сывороток им И.И. Мечникова РАН. М., 2010. 321 с.
6. Инкубация с основами эмбриологии / Н. П. Третьяков [и др.]. М.: Агропромиздат, 1990. 192 с.
7. Кривошипин И. П. Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы. Методические рекомендации. Сергиев Посад, 1997. 32 с.
8. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. МУ 3.3.2.1758-03 // gost.gtsever.ru.
9. Осипова Н. И. Репродукция вируса гриппа А птиц в первичной культуре клеток и аллантоисной полости куриных эмбрионов // Ветеринария. 2006. № 3. С. 663.
10. Сергеева М. В. Повышение качества вакцин против гриппа А/Н5N1 путем увеличения стабильности гемагглютинаина и использование нового донора репродукции: автореф. ... канд. биол. наук; НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского РАМН. СПб., 2013. 21 с.
11. Способ выделения вируса из аллантоисной жидкости зараженного куриного эмбриона: Пат. RU2116796 С1. 10.08.1998 / Пискунов С. З., Пискунов Г. З., Завьялов Ф. Н. № 95100163/14; заявл. 05.01.1995.

REFERENCES

1. Copyright certificate 1375645 A1 USSR, IPC C12M 3/00. Device for seeding influenza virus in developing chicken embryos / G. B. Kartashov. No. 4039823; applicant All-Union Scientific Research Design Institute of Applied Biochemistry; dec. 03/19/1986; publ. 02/23/1988. (In Russ.).
2. Copyright certificate 1458381 A1 USSR, IPC C12M 1/00. Device for extracting allantoic fluid from eggs with chicken embryos / G. G. Bader. No. 4089916; dec. 07/28/1986; publ. 02/15/1989. (In Russ.).
3. Bessarabov B. F. Incubation of eggs with the basics of poultry embryology / B. F. Bessarabov. Moscow : KolosS; 2006. 240 p. (In Russ.).
4. Vasiliev Yu. M., Rudneva I. A., Koptyaeva I. B. Comparative reproduction of avian influenza viruses in cell culture and chicken embryos. *Problems of Virology*. 2009;54(4);18–24. (In Russ.).
5. Vasiliev Yu. M. Optimization of reproduction of avian influenza viruses in various substrates and improvement of inactivated vaccines against avian influenza virus : dis. ... cand. biol. sciences; Research Institute of Vaccines and Serums named after I.I. Mechnikov RAS. Moscow; 2010. 321 p. (In Russ.).
6. Incubation with the basics of embryology / N. P. Tretyakov et al. Moscow: Agropromizdat; 1990. 192 p. (In Russ.).
7. Krivoshipin I. P. Incubation of poultry eggs. Guidelines. Sergiev Posad; 1997. 32 p. (In Russ.).
8. Methods for determining the quality indicators of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza. MU 3.3.2.1758-03 // gost.gtsever.ru. (In Russ.).
9. Osipova N. I. Reproduction of influenza A virus in birds in primary cell culture and allantoic cavity of chicken embryos. *Veterinary*. 2006;(3):663. (In Russ.).
10. Sergeeva M. V. Improving the quality of vaccines against influenza A/H5N1 by increasing the stability of hemagglutinin and the use of a new reproductive donor: author. ... cand. biol. sciences; Research Institute of Virology named after D.I. Ivanovsky RAMS. Saint Petersburg; 2013. 21 p. (In Russ.).
11. Method for isolating the virus from the allantoic fluid of an infected chicken embryo: Pat. RU2116796 C1. 08/10/1998 / Piskunov S. Z., Piskunov G. Z., Zavyalov F. N. No. 95100163/14; dec. 01/05/1995. (In Russ.).

Статья поступила в редакцию 15.03.2023; одобрена после рецензирования 20.03.2023; принята к публикации 27.03.2023.

The article was 15.03.2023; approved after reviewing 20.03.2023; accepted for publication 27.03.2023.

