

МУЗИКА Д.В., канд. вет. наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», dmuzyka77@gmail.com

АНТИГЕННА АКТИВНІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ СЕРІЙ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ З РІЗНИМ РІВНЕМ ГЕМАГЛЮТИНІНІВ

За результатами досліджень вивчена антигенна активність експериментальних серій інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці з різним рівнем гемаглютинінів. Встановлено залежність антигенних властивостей від рівня гемаглютинінів в інактивованих антигенах, що входять до складу вакцини. Так, у курчат, дворазово щеплених вакцинами проти ВППП H5N1 з рівнем гемаглютинінів від 1:512 до 1:128, середній рівень антитіл становив $9,0 \pm 0,77 - 7,66 \pm 0,44 \log_2$ через 30 днів після щеплення. Напруженість імунітету у курчат – 100%. Водночас за використання для щеплення курчат вакцини з рівнем гемаглютинінів 1:64 середній рівень антитіл становив $5,0 \pm 1,41 \log_2$. Визначено, що рівень гемаглютинінів в інактивованих антигенах для вакцин повинен бути не нижче ніж 1:512, а оптимальними є значення 1:1024–1:2048, яке може забезпечити високий рівень захисту у щепленої птиці.

Ключові слова: високопатогенний грип птиці, вакцина, рівень специфічних антитіл, активність інактивованих антигенів.

Постановка проблеми. Високопатогенний грип птиці залишається великою небезпекою для птахівництва в усьому світі, незважаючи на той факт, що кількість зареєстрованих спалахів цього захворювання у світі останнім часом значно зменшилася порівняно з 2005-2008 роками. Починаючи з 1959 року, у світі відбулось 29 епізоотій високопатогенного грипу птиці, спричинених вірусами грипу підтипів H5 і H7. Найбільша з них вразила більше країн та призвела до загибелі більшої кількості птиці, ніж інші 28. Ця епізоотія високопатогенного грипу птиці H5N1 розпочалась у 1996 році та спричинила загибель та знищення понад 250 млн свійських і диких птахів у 63 країнах за 16 років.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Незважаючи на той факт, що основними заходами, які можуть попередити виникнення захворювання, а у разі його спалаху значно обмежити подальше поширення, є суворе дотримання ветеринарно-санітарних вимог за утримання птиці у господарствах різних форм власності та напряму продуктивності. Найбільш ефективним заходом ерадикації та контролю подальшого поширення високопатогенного грипу птиці є повне знищення усього інфікованого поголів'я. Достатньо велика увага науковців та практиків у різних країнах світу приділяється розробці та вдосконаленню засобів специфічної профілактики високопатогенного грипу птиці. Міжнародне епізоотичне бюро не виключає використання інактивованих вакцин, як додаткових засобів контролю та ерадикації цієї інфекції [1, 2, 3, 4]. Як додатковий захід контролю високопатогенного грипу птиці, вакцинація вже була застосована в ряді країн світу, в тому числі в США, Мексиці, Італії, Пакистані, Російській Федерації. Доведено, що вакцинація зменшувала захворюваність і летальність, негативний вплив вірусу на продуктивність птиці, зумовлюючи зниження економічних збитків [5, 6, 7]. Із загальної кількості країн, постраждалих від високопатогенного грипу птиці, тільки 15 використовували вакцинацію. У 5 країнах (Китай, Єгипет, Індонезія, В'єтнам, Гонконг) були розгорнуті національні програми вакцинації. У більшості випадків були використані інактивовані вакцини. На сьогодні 6 країн світу, серед яких Китай, Єгипет, Індонезія, є стаціонарно неблагополучними щодо цієї інфекції [8]. В більшості випадків застосування вакцинації забезпечило захист птиці від клінічних ознак і загибелі, але в деяких вакцинованих стадах реєстрували захворювання як результат неправильної вакцинації або невідповідної адміністративної стратегії. Крім того, у деяких країнах спостерігався антигенний дрейф польових вірусів як результат тиску вакцинного вірусу. Таким чином, питання застосування вакцин для контролю високопатогенного грипу птиці залишається відкритим та потребує подальших наукових досліджень. На думку багатьох науковців світу, існує необхідність у розробці вакцинних препаратів та їх впровадженні у місцях потенційних ризиків виникнення та поширення осередків грипу. Стратегії застосування вакцин є предметом найбільших суперечок у науковій спільноті. Більшість вчених вважає за доцільне щеплення птиці у присадибних маєтках, що, на їх думку, має забезпечити надійне переривання епізоотичного ланцюга між носіями вірусу (дика птиця) та сприйнятливим поголів'ям (сільськогосподарська птиця).

На сьогодні у світі застосовують вакцинні препарати виробництва компаній «Intervet», «Fort Dodge», «Merial», які базуються на застосуванні інактивованих вірусних антигенів, емульсованих з ад'ювантними композиціями. Аналогічним способом виготовляються вакцини на просторі СНД,

зокрема і вакцини проти високопатогенного грипу птиці зі штамів підтипу H5N1, які зумовили спалахи хвороби на території Російської Федерації, Казахстану та інших держав. Ці вакцини розроблені та використовуються для контролю хвороби на території Російської Федерації [9].

В Україні в ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» створена вітчизняна інактивована вакцина проти високопатогенного грипу птиці підтипу H5N1. Як виробничий штам використано штам А/курка/Сиваш/02/05 H5N1, отриманий із польового епізоотичного ізоляту вірусу, який було ізолювано із патологічного матеріалу хворих курей в АР Крим в 2005 році.

Мета досліджень – вивчення антигенних властивостей експериментальних серій інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці, до складу яких входить інактивований вірус високопатогенного грипу птиці H5N1 з різним рівнем гемаглютининів.

Матеріали та методи досліджень. Виготовлення експериментальних серій інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці підтипу H5N1 «АвіФлуВак-ІЕКВМ» проводили за відпрацьованою схемою, але в ролі інактивованих антигенів використали інактивований вірус високопатогенного грипу птиці H5N1 – виробничий штам А/курка/Сиваш/02/05 з різним титром гемаглютининів 1:512, 1:256, 1:128 та 1:64 (табл. 1). Як ад'ювант було використано комерційний ад'ювант Монтанід ІСА 70 (Seppic, Франція). У досліді використано 60 голів курчат яєчного кросу «Домінант» 45-добового віку. Вакцину вводили курчатам внутрішньом'язово в дозі 0,5 см³ дворазово з інтервалом 3 тижні. У складі вакцин використовували інактивований антиген вірусу.

Таблиця 1 – Гемаглютинуюча активність інактивованих антигенів експериментальних серій вакцин «АвіФлуВак-ІЕКВМ»

Експериментальна серія № 1 (е.с.1)	Інактивований антиген з титром гемаглютининів 1:512
Експериментальна серія № 2 (е.с.2)	Інактивований антиген з титром гемаглютининів 1:256
Експериментальна серія № 3 (е.с.3)	Інактивований антиген з титром гемаглютининів 1:128
Експериментальна серія № 4 (е.с.4)	Інактивований антиген з титром гемаглютининів 1:64

Рівень антитіл до вірусу високопатогенного грипу птиці визначали у сироватці крові курчат до вакцинації, через 21 добу після одноразового введення та через 30 днів після дворазового введення експериментальних вакцин в РЗГА згідно з рекомендаціями МЕБ [7] з використанням тест-системи «АвіФлуТест H5N1». Титр антитіл $\geq 5 \log_2$ (1:32) вважали захисним.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами було проведено декілька серій дослідів з метою вивчення оптимальної активності антигену, який необхідно закладати в інактивовану вакцину проти високопатогенного грипу птиці для отримання хорошої імунної відповіді у щепленої птиці. В зв'язку з тим, що провідна роль у формуванні специфічної імунної відповіді належить гемаглютинину вірусу грипу, нами було виготовлено 4 експериментальні серії інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» з різним рівнем гемаглютининів в інактивованих антигенах. Цими експериментальними серіями вакцини були щеплені курчата. Результати серологічних досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Рівень специфічних антитіл у курчат, щеплених експериментальними серіями вакцини проти високопатогенного грипу птиці з різним рівнем гемаглютининів

Вакцина	Рівень антитіл до вірусу грипу H5, \log_2		
	до вакцинації	через 21 добу після одноразового введення	через 30 днів після ревакцинації
«АвіФлуВак-ІЕКВМ», е.с.1	АТ відсутні	3,3±1,25	9,0±0,77
«АвіФлуВак-ІЕКВМ», е.с. 2	АТ відсутні	3,17±1,21	7,66±0,44*
«АвіФлуВак-ІЕКВМ», е.с. 3	АТ відсутні	0,83±0,83	7,8±0,89*
«АвіФлуВак-ІЕКВМ», е.с. 4	АТ відсутні	АТ відсутні	5,0±1,41*

Примітка. * – $P < 0,001$ порівняно з е.с.1

Оцінювання ефективності вакцинації птиці експериментальними серіями інактивованої вакцини проводили за рівнем специфічних антитіл до гемаглютининів вірусу грипу підтипу H5 з урахуванням протективного титру антитіл, який становить $5 \log_2$. Так, згідно з даними, наведеними в таблиці 2, ми встановили, що через 21 добу після одноразового щеплення експериментальні серії вакцини викликають формування низького рівня специфічних антитіл. Найкращі показники специфічного імунітету в цей період були зареєстровані у птиці, щепленої серіями № 1 та № 2 з рівнем гемаглютининів 1:512 та 1:256

відповідно, рівень специфічних антитіл становив $3,3 \pm 1,25$ та $3,17 \pm 1,21 \log_2$ відповідно. Але необхідно відзначити, що ці показники були нижче протективного рівня. У курчат, яким була введена вакцина серії № 3, рівень специфічних антитіл становив $0,83 \pm 0,83 \log_2$. Водночас у курчат, щеплених вакциною серії №4 з рівнем гемаглютининів 1:64, після одноразового введення в сироватці крові специфічних АТ виявлено не було.

Необхідно також зазначити, що після одноразового щеплення низькою була і напруженість імунітету, яка становила 40%, 20, 20, 0% відповідно у птиці, вакцинованої серіями №1, 2, 3 та 4.

Зовсім інша картина була зафіксована нами після ревакцинації птиці цими серіями вакцини. Так, встановлено, що через 30 днів після ревакцинації рівень антигемаглютининів у сироватці крові значно підвищився та становив у курчат, щеплених вакциною серії №1 – $9,0 \pm 0,77 \log_2$, серії №2 – $7,66 \pm 0,44 \log_2$, серії №3 – $7,8 \pm 0,89 \log_2$. Ці показники значно перевищували протективний рівень, що відзначає формування високого рівня специфічного імунітету проти ВПГП. Про це також свідчить і напруженість імунітету, яка у цієї птиці становила 100%. Що стосується курчат, які були вакциновані серією вакцини №4 з найменшим рівнем гемаглютининів (1:64), то через 30 днів після ревакцинації у них виявлені специфічні АТ до вірусу ВПГП, але рівень їх був невисоким – $5,0 \pm 1,41 \log_2$, хоча і відповідав протективному рівню АТ. Напруженість імунітету у курчат цієї групи становила 90%.

Необхідно зазначити, що у контрольної (невакцинованої) птиці протягом усього періоду спостереження антитіл до вірусу високопатогенного грипу не було виявлено. Крім того, під час клінічного спостереження птиця з дослідних та контрольних груп не відрізнялася. Птиця була активною, приймала корм.

Висновки. Таким чином, імунна відповідь курчат, дворазово щеплених експериментальними зразками інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці H5N1 з різним рівнем гемаглютининів від 1:512 до 1:128, була достатньо високою, що дозволяє доборе оцінювати антигенні властивості вакцин з таким рівнем гемаглютининів інактивованого вірусу грипу. Ці дані також свідчать про достатній антигенний потенціал цих вакцин, який підтверджується напруженістю імунітету. Водночас під час використання для щеплення курчат вакцини експериментальної серії з рівнем гемаглютининів 1:64, нами встановлено низьку імунну відповідь, що свідчить про недостатній рівень гемаглютининів для формування необхідного протективного рівня. Проаналізувавши отримані результати, ми дійшли до висновку, що у разі створення інактивованих вакцин проти ВПГП, особливе значення для подальшої антигенної активності цього біопрепарату має рівень гемаглютининів інактивованого вірусу, який є основою вакцини. Нами встановлено, що інактивована вакцинна сировина вірусу високопатогенного грипу птиці повинна мати рівень гемаглютининів 1:512 та вище, оптимальне значення – 1:1024–1:2048.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Capua, I. Vaccination for notifiable avian influenza in poultry [Text] / I.Capua // Rev Sci Tech. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 217-227.
2. Capua, I. Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data? [Text] / I.Capua, D.J. Alexander // Zoonoses Public Health – 2008. – Vol.55, № 1. P. 2-15.
3. Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006 [Text] / S. Zohari [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2006. – Vol. 12, N 7. – P. 1167-1169.
4. H5N1 Influenza Virus, Domestic Birds, Western Siberia, Russia [Text] / A.M. Shestopalov [et al.] // Virus Genes. – 2008. – Vol. 36, N 1. – P. 117-125.
5. The definition of avian influenza and the use of vaccination against avian influenza. Sanco/B3/AH/R17/2000 [Text] / European Commission 2000 // Diseases of Poultry / Y. M. Saif. — John Wiley & Sons, 2011. — P. 134.
6. Villareal, C. L. The Mexican avian influenza (H5N2) outbreak [Text] / C. L. Villareal, A. O. Flores // Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza / D. E. Swayne, R. D. Slemons (eds.); U.S. Animal Health Association. — Richmond, VA, 1998. — P. 18–22.
7. Outbreaks of low pathogenicity avian influenza in U.S.A. [Text] / D. A. Halvorson [at al.] // Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza / D. E. Swayne, R. D. Slemons (eds.); U.S. Animal Health Association. — Richmond, VA, 1998. — P. 36–46.
8. Avian influenza [Text] / ed. D. E. Swayne. — Blackwell Publishing, 2008. — 605 p.
9. Високопатогенний грип птиці [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.], — Х. : ТОВ «Повнокопір», 2006. — 144 с.
10. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int> – Заголовок з екрану

Антигенная активность экспериментальных серий инактивированной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц с разным уровнем гемагглютининов
Д.В. Музыка

В результате проведенных исследований изучена антигенная активность экспериментальных серий инактивированной вакцины против высокопатогенного гриппа с различным уровнем гемагглютининов. Установлена зависимость антигенных свойств вакцины от уровня гемагглютининов в инактивированных антигенах, входящих в состав вакцины. Так, у цыплят, двукратно вакцинированных вакцинами против высокопатогенного гриппа птицы с уровнем гемагглютининов от 1:512 до 1:128, средний уровень антител составлял $9,0 \pm 0,77 - 7,66 \pm 0,44 \log_2$ через 30 дней после вакцинации. В тоже время при использовании для вакцинации цыплят вакцины с уровнем гемагглютинина 1:64 средний уровень антител составлял $5,0 \pm 1,41 \log_2$. Определено, что уровень гемагглютининов в инактивированных антигенах для вакцин должен быть не ниже 1:512, а оптимальным является титр 1:1024–1:2048, который может обеспечить высокий уровень защиты у вакцинированной птицы.

Ключевые слова: высокопатогенный грипп птицы, вакцина, уровень специфических антител, активность инактивированных антигенов.

Antigenic activity of experimental series of inactivated vaccines against highly pathogenic avian influenza with different levels of hemagglutinins

D. Muzyka

In the results of studies it was examined antigenic activity of experimental series of inactivated vaccine against highly pathogenic avian influenza with different levels of hemagglutinin. The dependence of the antigenic properties of the vaccine on the hemagglutinin levels in inactivated antigens, which are part of the vaccine was established. Thus, in chickens vaccinated twice with vaccines against highly pathogenic avian influenza with hemagglutinin level since 1:512 to 1:128, the average level of antibodies was $9,0 \pm 0,77 - 7,66 \pm 0,44 \log_2$ in 30 days after vaccination. At the same time using the vaccine for the vaccination of chickens with the hemagglutinin level 1:64 average antibody level was $5,0 \pm 1,41 \log_2$. It was determined that the hemagglutinin level in inactivated antigens for vaccines should not be lower then 1:512, and optimal titer is 1:1024 - 1:2048, which can provide a high level of protection at vaccinated birds.

Key words: highly pathogenic avian influenza, vaccine, specific antibody level, the activity of inactivated antigens.