

АНТИГЕННІ ТА ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ «АВІФЛУВАК-ІЕКВМ» У ЛАБОРАТОРНИХ ТА ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

Бісюк І.Ю.

Державний комітет ветеринарної медицини України, м. Київ,

Стегній Б.Т., Музика Д.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Високопатогенний грип птиці є одним з найнебезпечніших вірусних захворювань сільськогосподарської та дикої птиці. При виникненні захворювання найбільш ефективним та радикальним методом є «стемпінг-аут», тобто повне знищення ураженого поголів'я, а інколи й усього поголів'я птиці на загрозливій території. Іноді для контролю розповсюдження захворювання використовуються інактивовані вакцини, але Міжнародне епізоотичне бюро та інші міжнародні організації (ЄС, ФАО) не підтримують їх використання. Але все ж таки в деяких країнах вакцинація була вдало використана для контролю розповсюдження інфекції. На сьогоднішній день існує велика кількість вакцин різних виробників, які пропонуються для специфічної профілактики грипу птиці, що викликаний різними підтипами вірусу [1, 2]. Науковцями ННЦ «ІЕКВМ» розроблено інактивовану вакцину проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ», яка за результатами доклінічних випробувань відповідає всім вимогам міжнародних та вітчизняних стандартів щодо своєї ефективності та біологічної безпечності [3].

Метою наших досліджень була перевірка та порівняння антигенних та імуногенних властивостей, а також визначення біобезпечності інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці при проведенні лабораторних та виробничих випробувань.

Матеріали та методи. Визначення антигенних та імуногенних властивостей інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» проводилися в рамках міжвідомчих комісійних випробувань згідно наказу Голови Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України №56 від 18 липня 2006 року, а також в рамках виробничих випробувань згідно наказів ДДВМ № 93 від 9 листопада 2006 року і № 65 від 18 червня 2007 року. Лабораторні та виробничі випробування проводилися на Херсонському державному підприємстві - біологічна фабрика, в с. Новопокровка Новотроїцького району Херсонської області, у вірусологічному відділі Центральної державної лабораторії ветеринарної медицини, у відділі вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» під керівництвом Державного комітету ветеринарної медицини України та під контролем Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів та за участі представників Держптаховетцентру і Новотроїцького районного управління ветеринарної медицини.

У дослідження була використана вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» серія № 9 виготовлена 26.08.2006 та серія № 1 виготовлена 15.01.2007, ТУ У 24.4-23524007-062:2006, реєстраційний номер 2297-04-0267-06, виробництва ДП «Ветеринарна медицина». Вакцину вводили птиці згідно з листівкою вкладкою. При проведенні лабораторних досліджень було вакциновано 40 голів курчат 45-добового віку з ревакцинацією через 3 тижні. При проведенні виробничих випробувань було вакциновано 4599 голів сільськогосподарської птиці, в тому числі курей 2489 голів, гусей – 981, качок – 1059, індиків – 70. У якості контролю використовували невакциновану птицю.

Визначення антигенних властивостей вакцини проводили за рівнем специфічних антитіл у сироватці крові сільськогосподарської птиці, а також напруженістю імунітету. Відбір крові для досліджень проводили через 30 днів після ревакцинації. Наявність специфічних антитіл у сироватці крові визначали за допомогою реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) за загальноприйнятими методиками МЕБ [2]. Для серологічних досліджень було використано тест-систему «АвіФлуТест-Н5Н1» (ННЦ «ІЕКВМ», Харків, Україна), а також антиген грипу птиці Н5Н3 ВАТ «Покровський завод біопрепаратів» (Покров, Російська Федерація), «Антиген вірусу гриппа підтипа Н5Н1 сухой для серологических реакций» («ФДУ ВНДІЗТ», Російська Федерація).

Перевірку імуногенних властивостей вакцини проводили шляхом контрольного інфікування вакцинованої птиці у лабораторних умовах через 28 днів, а в виробничих умовах через 110 днів після дворазового щеплення, а також шляхом визначення ступеню вірусовиділення епізоотичного вірусу у вакцинованої птиці після контрольного зараження. Для цього протягом 5 днів після інфікування у птиці відбирали клоакальні змиви, які потім використовувалися для вірусологічних досліджень. Контрольне зараження та вірусологічні дослідження проводили згідно рекомендацій МЕБ [2].

Результати досліджень. *Клінічне спостереження за птицею.* Після проведення щеплення за вакцинованою та невакцинованою птицею проводили клінічне спостереження. Як при проведенні лабораторних так і при виробничих випробуваннях у сільськогосподарської птиці різних видів та віку не виявлено будь-яких відхилень від фізіологічної норми. Птиця була активною, споживала корм та воду в межах фізіологічної норми, поведінка не змінювалась.

Визначення антигенних властивостей. Для визначення антигенних властивостей вакцини при проведенні лабораторних випробувань від 20 курчат, що утримувалися на Херсонському державному підприємстві - біологічна фабрика, були відібрані проби крові для отримання сироватки. Сироватки крові для виявлення антитіл до вірусу грипу Н5Н1 досліджували в РЗГА за допомогою трьох комерційних діагностичних тест-систем. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Визначення рівня антитіл у курей до вірусу Н5Н1 при проведенні лабораторних випробувань вакцини «АвіФлуВак-ІЕКВМ»

№ курки	Тест-системи		
	«АвіФлуТест Н5Н1» тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу Н5Н1 в РЗГА (ННЦ «ІЕКВМ»)	«Антиген вірусу гриппа підтипа Н5Н1 сухой для серологических реакций» («ФДУ ВНДІЗТ»)	«Антиген для діагностики гриппа птиц Н5Н3» (ВАТ «Покровський завод біопрепаратів»)
	Титри антитіл		
Вакциновані курчата			
1	2	3	4
0707	1:2048	1:4096	1:512
0716	1:4096	1:4096	1:512
3253	1:4096	1:4096	1:2048

Продовження табл. 1

1	2	3	4
1889	1:2048	1:2048	1:1024
2675	1:2048	1:4096	1:1024
0708	1:2048	1:4096	1:1024
0787	1:4096	1:1024	1:512
0741	1:2048	1:1024	1:512
2645	1:4096	1:4096	1:1024
1891	1:4096	1:2048	1:128
2467	1:4096	1:4096	1:2048
0733	1:4096	1:2048	1:2048
2486	1:4096	1:4096	1:2048
2602	1:4096	1:4096	1:1024
2479	1:4096	1:4096	1:256
2671	1:2048	1:4096	1:128
2632	1:2048	1:256	1:128
0495	1:2048	1:2048	1:256
0755	1:1024	1:1024	1:256
2619	1:1024	1:1024	1:1024
Середній титр, log ₂	11,4±0,68	11,2±1,1	9,25±1,37

Таким чином нами було встановлено, що інактивована вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» має добрі антигенними властивостями та викликає утворення у курей специфічних антитіл в високих титрах від 9,25 log₂ до 11,4 log₂ в залежності від використаної тест-системи. Напруженість імунітету становила 100 %. В той же час у невакцинованої птиці антитіл до цього вірусу грипу виявлено не було.

Аналогічні дослідження нами проведені при виробничих випробуваннях. Через 30 днів після ревакцинації у сільськогосподарської птиці різних видів (кури, качки, гуси, індки) з присадибних господарств с. Новопокровка Новотроїцького району було відібрано проби крові для серологічних досліджень. Результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Рівень антитіл у сироватці крові сільськогосподарської птиці до вірусу H5N1 при проведенні виробничих випробувань вакцини «АвіФлуВак-ІЕКВМ»

Вид птиці	Показника специфічного імунітету	Рівень антитіл в сироватці крові через 30 днів після ревакцинації
		Антиген «АвіФлуТест-Н5N1»
Кури	Середній титр, log ₂	8,82
	Напруженість, %	97,4
Качки	Середній титр, log ₂	7,45
	Напруженість, %	100
Гуси	Середній титр, log ₂	7,05
	Напруженість, %	100
Індки	Середній титр, log ₂	6,83
	Напруженість, %	100

Нами було встановлено, що інактивована емульсована вакцина проти високопатогенного грипу «АвіФлуВак-ІЕКВМ» після дворазового введення сільськогосподарській птиці забезпечує напрацювання специфічних антитіл проти гемаглютиніну H5 у захисних та вище титрах. Середній титр антитіл становив від 8,82 до 6,83 log₂, напруженість імунітету у сільськогосподарської птиці приватного сектору становила 97,4-100 %.

Також було встановлено, що найкращою тест-системою для визначення антитіл та оцінки напруженості імунітету є тест-системи до складу яких входять гомологічні антигени. Використання інших антигенів можливе, але необхідно розуміти, що це в свою чергу може привести до невірної оцінки рівня та напруженості поствакцинального імунітету.

Визначення імуногенних властивостей. Для перевірки імуногенних властивостей вакцини було проведено контрольне зараження курей через 110 днів після дворазового щеплення при проведенні виробничих випробувань та через 30 днів після ревакцинації при проведенні лабораторних випробувань. Для цього було використано 5 вакцинованих та 5 невакцинованих курей. Зараження курей проводили згідно з вимогами МЕБ контрольним штамом вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/05(H5N1), депонованим в ДНКІБШМ (реєстраційний номер 383) внутрішньом'язево в дозі 50000 ЕЛД₅₀ на курку. Дослідження проводили з дотриманням вимог біологічної безпеки, інфіковану птицю утримували в боксах біозахисту «BioFlex P40» 3 класу. Впродовж усього періоду спостереження (10 днів) при лабораторних та виробничих випробуваннях у вакцинованих курей відхилень від фізіологічної норми не зареєстровано. У контрольній (не вакцинованої) птиці через 24 години після зараження зареєстровано усі класичні клінічні ознаки високопатогенного грипу птиці. Через 48-72 години після зараження вся контрольна (не щеплена) птиця загинула.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

Оцінка вірусовиділення контрольного вірусу після інфікування. Для оцінки вірусоносійства після інфікування контрольним епізоотичним вірусом щоденно від вакцинованих та невакцинованих курей відбирали клоакальні змиви. За птицею клінічно спостерігали протягом 7 днів.

Результати представлені в таблиці 3 та 4.

Таблиця 3 – Результати вірусологічних досліджень клоакальних змивів від невакцинованих курчат після контрольного інфікування

Досліджуваний матеріал	Кількість інфікованих ембріонів	Час після інфікування/кількість загиблих КЕ					
		24	48	72	96	120	РГА
Клоакальні змиви від невакцинованих курчат відібрані через 24 години після зараження	30	8	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від невакцинованих курчат відібрані через 48 годин після зараження	18	4	14				+++**

Примітка. *_ - відсутність загибелі ембріонів; **+++ - наявність гемаглютининів в екстраембріональній рідині; ***---- - відсутність гемаглютининів в екстраембріональній рідині

Таблиця 4 – Вірусологічні дослідження клоакальних змивів від вакцинованих курчат після контрольного зараження

Досліджуваний матеріал	Кількість інфікованих ембріонів	Час після інфікування/загибель КЕ					
		24	48	72	96	120	РГА
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 24 години після зараження	30	9	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 48 годин після зараження	30	3	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 72 години після зараження	30	0	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 96 годин після зараження	30	1	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 120 годин після зараження	30	1	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 144 години після зараження	30	1	_*	-	-	-	---**
Клоакальні змиви від вакцинованих курчат відібрані через 168 годин після зараження	30	4	_*	-	-	-	---**

Примітка. *_ - відсутність загибелі ембріонів; **+++ - наявність гемаглютининів в екстраембріональній рідині; ***---- - відсутність гемаглютининів в екстраембріональній рідині

При проведенні вірусологічних досліджень в пробах екстраембріональної рідини від ембріонів інфікованими клоакальними змивами від вакцинованих курей гемаглютининів не виявлено. Гемаглютинини виявлено в пробах екстраембріональної рідини курячих ембріонів, які заражені клоакальними змивами від невакцинованих (контрольних) курей в титрах 1:512-1:1024. Що свідчить про відсутність репродукції вірусу у вакцинованих курей та про високу репродукції його у невакцинованих курей.

При проведенні ПЛР в клоакальних змивах від невакцинованої (контрольної) птиці встановлено наявність РНК вірусу грипу підтипу H5N1, в усіх зразках від вакцинованої птиці РНК вірусу грипу не виявлено.

Таким чином, як при проведенні лабораторних, так і виробничих випробувань була встановлена висока імуногенна активність інактивованої емульсованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ». Доведено, що кури з Херсонського державного підприємства - біологічна фабрика при лабораторних випробуваннях та птиця з присадибних господарств с. Новопокровка Новотроїцького р-ну Херсонської області при проведенні виробничих випробувань, щеплені інактивованою емульсованою вакциною проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» та заражена контрольним епізоотичним вірусом високопатогенного грипу через 30 та 110 днів після ревакцинації не виділяла з екскретами інфекційно активного вірусу, залишалася клінічно здоровою протягом усього періоду спостереження.

Висновки:

1. Інактивована емульсована вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» володіє добрими антигенними властивостями у лабораторних умовах забезпечує формування у дослідних курей 100% напруженого імунітету з високим рівнем специфічних антитіл в сироватці крові $11,4 \log_2$.

2. Інактивована емульсована вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» у виробничих умовах забезпечує формування у сільськогосподарської птиці різних видів напруженого імунітету (97,4 - 100%) з високим рівнем специфічних антитіл в сироватці крові від 8,82 до 6,83 \log_2 (в залежності від виду птиці).

3. Вакцина «АвіФлуВак-ІЕКВМ» має добрі імуногенні властивості. Дворазова вакцинація забезпечує формування імунітету, який захищає птицю як в лабораторних, так і виробничих умовах від прямого інфікування контрольним епізоотичним вірусом, блокує його репродукцію в організмі птиці.

4. Антигенна та імуногенна активність інактивованої емульсованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» повністю відповідає вимогам ТУУ 24.4-23524007-062:2006 та за результатами випробувань може бути використана в разі необхідності для специфічної профілактики сільськогосподарської птиці в зонах ризику його виникнення та поширення.

Список літератури

1. Високопатогенний грип птиці [Текст] / Б.Т.Стегній [та ін.]: Под ред. Докт. вет. наук., проф., член-кор. УААН Стегнія Б.Т. – Х.: ННЦ "ІЕКВМ". – 2006. – 144 с. 2. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int>. – Заголовок з екрану. 3. Розробка вітчизняних засобів специфічної профілактики та діагностики високопатогенного грипу птиці в Україні [Текст] / Г.Б. Іванов [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – №11. – 2007. – С. 27-31.

ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF INACTIVATED VACCINE AGAINST HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA «AVIFLUVAK-IECVM» IN LABORATORY AND WORKING CONDITIONS**Bisyuk I.Yu.**

State Committee of Veterinary Medicine of Ukraine, Kyiv

Stegniy B.T., Muzyka D.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Results of study of antigenic and immunogenic properties of inactivated vaccine against highly pathogenic avian influenza "AviFluVak-IECVM" at carrying out of laboratory and working tests are presented in the article. The level of antibodies in poultry of different species (chickens, ducks, geese, turkeys) after double-ply vaccination and results of control infection of poultry by highly pathogenic virus are given. There was determined, that using of vaccine "AviFluVak-IECVM" for specific prophylaxis of highly pathogenic avian influenza in working conditions provide in poultry the formation of stable tense immunity which able to protect birds from disease.

УДК 619:616.579.887.111

РОЗРОБКА ДУПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КОНТАМІНАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ МІКОПЛАЗМАМИ ТА ЗБУДНИКОМ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВРХ**Болотін В.І.¹**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Технології виробництва імунологічних препаратів потребують постійного вдосконалення. Зокрема, важливе значення мають засоби контролю сировини тваринного походження, а також готової продукції щодо стерильності та виключення контамінації мікоплазмами і сторонніми вірусами. Це також стосується перещеплюваних культур клітин, що використовуються у наукових дослідженнях та біотехнологічних цілях, які можуть бути джерелом ризиків отримання недостовірних результатів, оскільки сторонні агенти впливають майже на всі показники та параметри клітин *in vitro*. Оцінку цих об'єктів наглядно щодо контамінації проводять із загальноприйнятими вимогами, викладеними у чинних нормативних документах України (ГОСТ 28085-89, ДСТУ 4483:2005, ДСТУ 4613:2006).

Сироватка крові ВРХ, яка в якості поживної субстанції застосовується при виготовленні імунобіологічних препаратів, вакцин, препаратів для контролювання вторинних інфекцій та діагностиків, може бути контамінована мікоплазмами внаслідок недотримання правил відбору, транспортування, фільтрації та зберігання крові. Джерелом розповсюдження мікоплазм може бути також персонал за недотримання вимог та правил належної практики вірусологічної роботи. Вірусна контамінація біопрепаратів та поживних субстанцій, зумовлена здебільшого збудником вірусної діареї ВРХ, є проблемою номер один у сучасній біопромисловості. За результатами багатьох досліджень до 75 % серій сироваток крові ВРХ та до 15 % клітинних ліній можуть бути контаміновані збудником ВД ВРХ [1].

Полімеразна ланцюгова реакція є високочутливим та високоспецифічним методом, здатним виявляти генетичний матеріал інфекційного агенту навіть за незначних концентрацій, коли традиційним методам не вистачає чутливості. Для прискорення отримання результатів використовують мультиплексну ПЛР, суть якої полягає в одночасному визначенні декількох інфекційних агентів в одному зразку [2].

Метою даної роботи було розробити дуплексну ПЛР та оптимізувати протокол ампліфікації для одночасного виявлення генетичного матеріалу мікоплазм та вірусу діареї ВРХ.

Матеріали і методи. З метою запобігання виникнення димерів та неспецифічних ампліконів проводили теоретичні дослідження обраних систем праймерів щодо сумісності їх одночасного використання. Для цього застосовували комп'ютерні програми ArliFX 1.1 та AutoDimer 1.0 [3], а також дані, що були отримані у режимі on-line з баз даних EMBL та GenBank.

Виділення нуклеїнових кислот проводили за допомогою методу сорбції [4]. Після проведення зворотної транскрипції, здійснювали реакцію ампліфікації за допомогою систем праймерів BVDV_F/R для виявлення вірусу діареї ВРХ [5] та F_1/2 [6] – для мікоплазм. Як позитивний контроль використовували зразки розплідки вірусу діареї ВРХ штаму Oregon, а також 500 нг ДНК референтних штамів *M. orale* N-1, *M. hyorhinis* BTS-7 та *M. bovis* PG45T.

З метою отримання чіткої візуалізації ампліконів та уникнення утворення неспецифічних продуктів реакції проводили оптимізацію протоколу ПЛР за показниками температури відпалу, концентрації праймерів та іонів магнію, кількості ампліфікаційних циклів.

Облік результатів реакції проводили за допомогою УФ-світла після проведення електрофорезу в 1 % агарозному гелі за сили току 30 mA та напруженості 15 В/см.

За допомогою розробленої методики перевіряли сировину для виготовлення імунобіологічних препаратів та зразки культури клітин FLK щодо контамінації вірусом діареї ВРХ та мікоплазмами.

Результати досліджень. Для розробки дуплексної ПЛР на першому етапі було обрано системи праймерів для детекції збудника ВД ВРХ та збудників класу *Mollicutes* за двома показниками: відхилення температур відпалу праймерів повинно складати ± 2 °C. Для отримання чітких результатів необхідно, щоб обрані праймери обмежували ділянки генів розмірами, що відрізняються між собою в межах 100-300 п.н., адже час елонгації буде однаковий. З метою уникнення утворення шпильок та

¹ Науковий керівник – док. вет. наук, проф., акад. НААН України Б.Т.Стегній