

УДК 619:578.832.1:636.5

ИЗУЧЕНИЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ЦЫПЛЯТ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВ ГРИППА

Гусев А.А., Минчук Ю.Н.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск

Грипп птиц – острое контагиозное вирусное заболевание домашних, синантропных и диких пернатых, характеризующееся поражением респираторных органов, желудочно-кишечного тракта и нервной системы, сопровождающееся сезонными эпизодами с различным уровнем смертности в зависимости от степени патогенности возбудителя.

Вирус гриппа типа А характеризуется высокой антигенной изменчивостью поверхностных белков – гемагглютинаина и нейраминидазы, благодаря сегментированной структуре генома. Это создает условия для генетической нестабильности вируса, возможности его мутации, в результате чего могут появиться штаммы, обладающие повышенной вирулентностью и контагиозностью, способные быстро распространяться среди восприимчивого поголовья.

В последнее время ситуация по данному заболеванию во многих странах мира сильно обострилась. В связи с быстрым распространением эпизоотии, грипп птиц стал реальной проблемой для птицеводства.

Как и для большинства других вирусных инфекций, важным средством борьбы с гриппом является вакцинопрофилактика. С этой целью в современном птицеводстве наиболее часто применяются инактивированные препараты, включающие полные ценные вирионы в смеси с адьювантами в эффективном соотношении [1].

Цель опыта: Установить оптимальный способ и кратность вакцинации для формирования в сыворотке крови цыплят защитного уровня специфического иммунитета.

Материалы и методы. Исследования проводились в условиях отдела эпизоотологического и иммунологического мониторинга РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского».

Для изготовления вакцины в качестве вирусного антигена использовали штамм вируса гриппа типа А H1N1. Вирус культивировали в 9-суточных куриных эмбрионах при введении в хорионаллантоисную оболочку 0,2мл вирусосодержащего материала, температура инкубации 37,0°C. Устанавливали гемагглютинирующую и инфекционную активность вируса в полученной экстраэмбриональной жидкости: инфекционный титр 8,25lg ЭИД₅₀/мл, гемагглютинирующий титр 7 log₂. Полученный материал очищали от примесей центрифугированием 25минут при 2тыс. об./мин. Инактивацию вируса проводили с помощью 0,01%-го раствора формалина в течение 24 часов при температуре 37°C. Полноту инактивации проверяли трехкратными пассажами на 9-суточных куриных эмбрионах, инокулируя по 0,2мл вирусосодержащего материала в хорионаллантоисную оболочку. Инкубировали куриные эмбрионы при температуре 37°C 120 часов. Гибель в течение 24 часов считали неспецифической. По окончании срока инкубации и охлаждения эмбрионов при температуре 4(±2)°C не менее 14 часов, стерильно отбирали экстраэмбриональную жидкость, проверяли ее в реакции гемагглютинации на стекле с 5%-й взвесью эритроцитов петуха. При отрицательном результате проводили второй, а затем и третий пассажи, инокулируя в хорионаллантоисную оболочку смесь равных объемов экстраэмбриональной жидкости от всех куриных эмбрионов. Инактивацию вируса считали полной, если экстраэмбриональная жидкость после третьего пассажа на куриных эмбрионах не агглютинировала эритроциты петуха.

Определение стерильности проводили по ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности», и согласно «Руководству МЭБ по стандартам для диагностических тестов и вакцин» на бактериальное загрязнение, исключение контаминации грибами и микоплазмами.

Вирус концентрировали добавлением ПЭГ-6000 в соответствии с методикой. Выдержав 24 часа при температуре 4(±2)°C, жидкость центрифугировали при 2тыс.об./мин. 25минут. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в соответствующем объеме фосфатно-солевого буфера.

В качестве адьюванта использовали гидроокись алюминия, которую добавляли в количестве 10% к объему вирусного антигена.

В качестве биологического объекта использовали 10-суточных цыплят-бройлеров кросса «Хаборт» в количестве 15 голов, серонегативных к вирусу гриппа типа А H1N1. Во время проведения опыта птица вдоволь получала воду и соответствующий возрасту корм. Для проведения опыта были сформированы четыре группы цыплят по 3 головы в каждой. Первой группе в 10-дневном возрасте вводили исследуемую вакцину однократно подкожно в области средней трети шеи в количестве 0,5мл. Второй группе – двукратно подкожно в среднюю треть шеи по 0,5мл на 10-й и 24-й день жизни. Третья группа была вакцинирована однократно внутримышечно в область бедра аналогичным количеством исследуемого материала в 10-дневном возрасте. Четвертая – двукратно внутримышечно в область бедра по 0,5мл вакцины на 10-й и 24-й день. Три птенца были взяты в качестве контроля и в течение всего периода опыта оставались серонегативными к вирусу гриппа типа А H1N1.

Антигенную активность вакцины оценивали по динамике накопления в сыворотке крови специфических антител. Для этого на 14 и 28 суток после введения препарата отбирали кровь и получали сыворотки. Их индивидуально исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), в которой использовали промышленный антиген, изготовленный из вируса гриппа типа А H1N1. Реакцию ставили микрометодом по общепринятой методике [2,3]. По результатам РТГА определяли среднегеометрический титр антител в сыворотке крови цыплят каждой группы. Далее изучали динамику формирования иммунного ответа и сравнивали ее между группами.

Результаты и обсуждение. Для того чтобы создать у птицы надежный иммунитет против гриппа, прибегают к вакцинации, при которой среднегеометрический защитный титр антител в РТГА должен быть не ниже 4,0 log₂ [4].

При постановке РТГА с сыворотками крови подопытных цыплят были получены следующие результаты (таблица).

Таблица 1 – Показатели среднегеометрических титров антител в сыворотках крови цыплят-бройлеров, вакцинированных против вируса гриппа типа А H1N1.

Кратность и способ вакцинации	Среднегеометрический титр антител, log ₂
Однократно подкожно, через 14 сут.	3,6±0,24
Однократно подкожно, через 28 сут.	4,7±0,33
Двукратно подкожно	5,3±0,88
Однократно внутримышечно, через 14 сут.	4,4±0,68
Однократно внутримышечно, через 28 сут.	4,0±0,58
Двукратно внутримышечно	5,3±0,88

У цыплят первой группы (однократное введение вакцины подкожно в среднюю треть шеи) среднегеометрический титр антител через 14 и 28 суток после вакцинации составил 3,6 log₂ и 4,7 log₂ соответственно. Это указывает, что однократная подкожная вакцинация данным препаратом вызывает образование защитного уровня антител только через 4 недели. У цыплят второй группы (двукратная подкожная вакцинация) уровень антител после повторного введения вакцины через 14 суток возрос по сравнению с первой группой и составил 5,3 log₂ (рисунок 1).

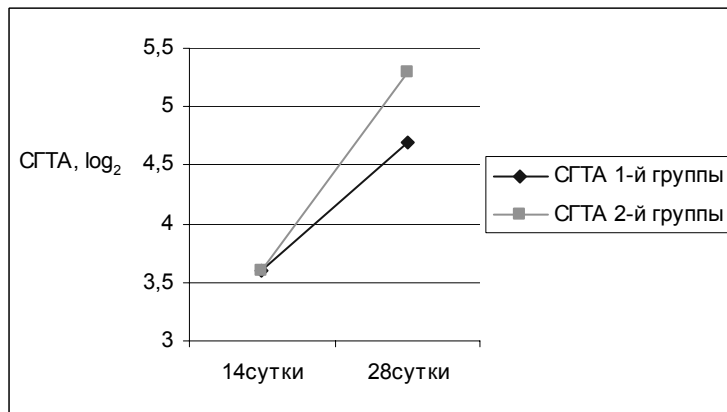


Рис.1 Динаміка середнегеометричних титрів антител в сировотках крові цыплят при підкожній імунізації.

В пробах сывороток крови цыплят третьей группы (однократная вакцинация внутримышечно в область бедра) среднеегеометрический титр антител через 14 и 28 суток после введения вакцины составил $4,4 \log_2$ и $4,0 \log_2$ соответственно. Данные показатели свидетельствуют о формировании у цыплят защитного уровня специфических антител после внутримышечной инокуляции препарата уже через 2 недели. К 28 дню логарифм среднеегеометрического титра немного снижается (на $0,4 \log_2$), но не ниже допустимой нормы. При повторной вакцинации данным способом титр антител к 28 дню возрастает и составляет $5,3 \log_2$ (рис. 2).

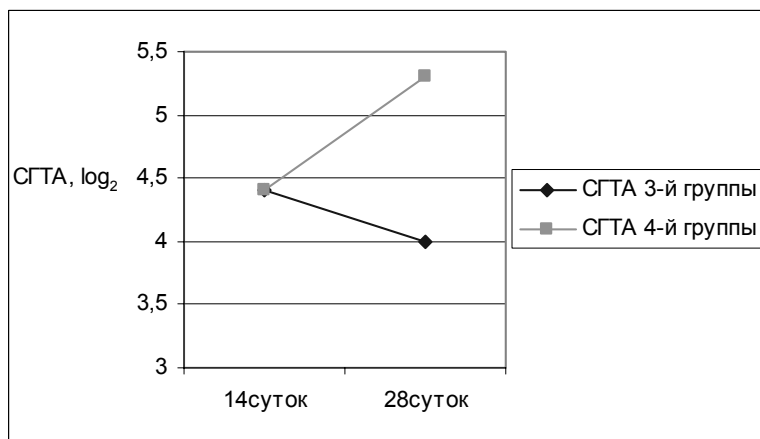


Рис.2 Динаміка середнегеометричних титрів антител в сировотках крові цыплят при внутримышечній вакцинації.

Цыплята контрольной группы на протяжении опыта оставались серонегативными к вирусу гриппа типа А подтипа H1N1.

Сравнив полученные результаты, мы установили, что однократная внутримышечная иммунизация способствует формированию защитного уровня иммунитета уже на 14 суток, по сравнению с однократной подкожной иммунизацией. Однако на 28 суток среднеегеометрический титр антител против вируса гриппа при подкожной вакцинации выше на $0,7 \log_2$ по сравнению с таковым показателем при внутримышечном введении вакцины. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что продуктивный период в динамике первичного иммунного ответа при однократной подкожной вакцинации продолжался в течение четырех недель, в то время как при однократной внутримышечной вакцинации на 28 суток был отмечен период затухания антителообразования.

Динамика иммунного ответа при двукратной вакцинации не зависела от способа введения препарата. Среднеегеометрический титр антител при этом был выше, чем при однократной иммунизации обоими способами. Поэтому, для формирования у цыплят защитного уровня специфического иммунитета, необходима двукратная вакцинация данным препаратом одним из указанных способом с интервалом 14 суток.

Список литературы

1. Изучение антигенной активности инактивированной эмульгированной вакцины против вируса гриппа птиц (H5N1) / А.В. Борисов [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2008. – №2. – С.46-47.
2. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных: Справочник / Сюрин, В.Н. [и др.]; под общ. ред. В.Н. Сюрин. – М: Агропромиздат, 1986. – 351с.
3. Руководство по ветеринарной вирусологии / Сюрин, В.Н. [и др.]; под общ. ред. В.Н. Сюрин. – М: Колос, 1966. – 687с.
4. Испытание вакцины против высокопатогенного гриппа птиц в эксперименте / Э.Д. Джавадов [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2006. – №3. – С. 40-41.

STUDY OF POSTVACCINAL IMMUNITY IN CHICKENS IMMUNIZED AGAINST INFLUENZA

Gusev A.A., Minchuk Yu. N.

RUP "Institute of Experimental Veterinary Science named after S.N. Vyshel'sky", Minsk, Belarus

Results of study of postvaccinal immunity in chickens immunized against influenza are presented in the article.