

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

правила ВП 13.3. 1310-96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных 8. Лептоспироз». — М.: Госкомсанэпиднадзор России, Минсельхозпрод России, 1996. — 11 с. 7. Урбан В. П. Лептоспироз свиней в крупном свиноводческом комплексе и его ликвидация / В. П. Урбан, Т. М. Киндрас, В. И. Шнур // Сб. науч. тр. — Л.: ЛВИ, 1976. — вып. 43. — с. 187-191.

SEROLOGICAL MONITORING ON PREVALENCE OF SWINE LEPTOSPIROSIS

Levitskaya I.L., Pisarenko V.F., Sapegin V.M., Jabina V.Yu., Shumskaya N.P., Kovalenko A.M.
Belgorod State Agricultural Academy

Information concerning the prevalence of swine leptospirosis in reproductive farms of Belgorod region by results of serological assays is presented in the article. The parity of positively reacting swine to the total of the investigated tests of blood serum is defined. The data about prevalence of some agents of swine leptospirosis are presented.

УДК 578.23:578.832.1

ИСПЫТАНИЕ ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА H5N1 НА МЫШАХ И КУРАХ В СРАВНЕНИИ С ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ

Ломакина^{1,2}Н.Ф., Бораева¹Е.Ю., Кропоткина¹Е.А., Дрыгин³В.В., Гамбарян¹А.С.

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва

²ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, РАСХН, г. Москва

³ФГУ ВНИИЗЖ, г. Владимир

Высокая антигенная изменчивость вируса гриппа А стимулирует совершенствование противогриппозных вакцин, как для людей, так и для сельскохозяйственной птицы. Традиционными долгое время оставались инактивированные вакцины. Одним из главных факторов для их производства является выбор штамма, который должен быть гомологичен циркулирующему вирусу, обладать высокими иммуногенными свойствами, хорошо и с высокой урожайностью размножаться в куриных эмбрионах (КЭ). Природные изоляты не всегда удовлетворяют этим требованиям, в частности, вирусы H5N1 из-за высокой патогенности вызывают быструю гибель КЭ, не успевая в них накопиться до нужного титра. В лабораторных условиях новые штаммы вирусов получают реассортацией и генно-инженерным способом.

«Обратная генетика» позволяет получить рекомбинантные вирусы с нужными свойствами, благодаря введению мутаций и модификаций в определенные участки генома [1, 2]. Созданные таким образом инактивированные вакцины против высокопатогенных вирусов H5 и H7 обеспечивают хорошую защиту и биологическую безопасность, однако имеют и некоторые недостатки.

Инактивированные вакцины стимулируют гуморальный иммунитет, защитные свойства которого могут быть малоэффективны в случае антигенного несоответствия циркулирующему вирусу; кроме того, процедура массовой вакцинация весьма трудоемка, а вакцины имеют высокую стоимость. Живые противогриппозные вакцины (ЖГВ) способны к более широкой перекрестной защите, поскольку одновременно стимулируют и гуморальный и клеточный иммунитет, а аэрозольный способ их введения значительно упрощает вакцинацию. Одно из обязательных требований к живым вакцинам – отсутствие выделения вируса в окружающую среду.

Живые противогриппозные вакцины для людей были разработаны на основе аттенуированных холодаадаптированных и термочувствительных штаммов, которые могут репродуцироваться в верхних дыхательных путях человека, не проникая в легкие из-за непермиссивности температуры выше 37 °С.

В России на протяжении многих лет вакцинные штаммы вируса гриппа A/H2N2 готовили на основе холодаадаптированного донорского штамма А/Ленинград/134/17/57. В Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) на основе этого «донора аттенуации», помимо ЖГВ, направленных против текущих эпидемических вариантов гриппа, была создана живая вакцина «Орвакс» с наружными генами (НА и NA) от штамма А/утка/Потсдам/1406-86 (H5N2). Данный вакцинный штамм безвреден, генетически стабилен и способен к репродукции в носоглотке человека. Такими же свойствами обладает и разработанная в США живая H5N1 вакцина, полученная на базе штамма А/Vietnam/1203/2004, с удалённым полиосновным сайтом в НА, и холодаадаптированного донора аттенуации А/Ann Arbor/6/60 [6].

Применение живых антигриппозных вакцин в птицеводстве остается спорным вопросом. С одной стороны, использование с этой целью природных непатогенных вирусов H5 и H7, выделенных от естественных хозяев, у которых их присутствие протекает бессимптомно, чревато непредсказуемыми последствиями. Анализ эпизоотий, вызванных вирусами H5 и H7 в разных частях мира, привел к выводу, что высокопатогенные вирусы эволюционировали из низкопатогенных предшественников, циркулировавших в дикой природе, в результате заноса в популяцию домашних птиц и адаптации к организму нового хозяина, сопровождающейся накоплением мутаций, ответственных за усиление вирулентности вируса [7]. В первую очередь, это касается изменения структуры сайта нарезания гемагглютинина – главного маркера патогенности вирусов H5 и H7.

С другой стороны, живые модифицированные и аттенуированные вакцины успешно применяются в птицеводстве для ряда инфекций, таких как болезни Ньюкастла, Гамборо, Марека, инфекционный ларинготрахеит и энцефаломиелит птиц. Накопленные сведения о маркерах вирулентности и аттенуации в сочетании с техническими возможностями позволяют конструировать живые противогриппозные вакцины. Одним из подходов к созданию таких вакцин является использование вирусов с делецией в гене, кодирующем NS1 белок [1].

Еще в 1982 году была высказана идея использования внутренних генов апатогенных вирусов гриппа птиц как доноров аттенуации для создания живых антигриппозных вакцин [8].

Целью нашей работы было получение реассортантных штаммов вируса гриппа H5 в качестве живых вакцин и их испытание на мышах и цыплятах в сравнении с инактивированными вакцинами при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении.

Были получены 4 реассортанта, у которых H5 гемагглютинин (HA) был от штамма A/Vietnam/1203/2004-PR8/CDC-RG или A/курица/Курган/3654ат/2005, а остальные гены от природного апатогенного вируса A/чайка/Москва/3100/2006 (H6N2) [3], либо A/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Вакцинный штамм A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG, у которого методом обратной генетики в HA удалён полиосновный сайт нарезания, предоставил доктор R. Donis (CDC, USA). Штамм A/курица/Курган/3654ат/2005 аттенуирован для мышей, но патогенен для цыплят и является производным вариантом высокопатогенного вируса A/курица/Курган/3/2005 (H5N1), у которого сохранился полиосновный сайт нарезания, но имеются замены Asp54Asn и Lys222Thr в HA1, Val48Ile и Lys131Thr в HA2, часть которых привела к снижению pH конформационного перехода [4].

Холодоадаптированный штамм A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и на его основе реассортант A/Нью-Каледония х Ленинград/134/17/57 были получены в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) и предоставлены Руденко Л.Г.

Генный состав реассортантов определяли секвенированием, либо в ПЦР с дифференцирующими праймерами [5]. Безопасность, иммуногенность и протективные свойства живых экспериментальных вакцин исследовали на мышах и цыплятах. Для сравнения использовали инактивированные вакцины на основе штаммов A/Vietnam/1203/04-PR8/CDC-RG (H5N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Контрольное заражение проводили штаммом A/курица/Курган/3/2005 (H5N1).

При интраназальной вакцинации мышей (табл. 1) гетерологичная инактивированная вакцина PR8/34 (H1N1) не защищала мышей от заражения высоковирулентным вирусом H5N1. Инактивированная вакцина на основе штамма VN-PR (H5N1), отличающегося от PR8/34 (H1N1) заменой только HA, была безопасна и обладала хорошими защитными свойствами, однако при испытании в живом виде штамм VN-PR вызывал полную гибель мышей.

Среди живых H5 вакцин (табл. 1) холодоадаптированные реассортанты VN-Len и Ku/at-Len по безопасности сравнимы с живой вакциной для людей NC-Len, а реассортанты на основе вируса чаек VN-Gull и Ku/at-Gull слабовирулентны – падеж мышей при иммунизации составил 8-10%, но гораздо безопаснее, чем вакцинный штамм VN-PR, вызвавший гибель у 80% мышей.

Таблица 1 – Безопасность и протективность штаммов вирусов гриппа от высоковирулентного вируса H5N1 на модели мышей

Вакцинный штамм	Обознач.	Подтип	Доза/мышь	Безопасность*	Защита**
Инактивированные вакцины					
A/Vietnam/1203/2004 х A/Puerto Rico/8/34/CDC-RG	VN-PR	H5N1	1 мкг	97± 3	98 ± 2
A/Puerto Rico/8/34	PR8/34	H1N1	1 мкг	98± 2	0
Живые экспериментальные вакцины					
A/Vietnam/1203/2004 х A/Puerto Rico/8/34/CDC-RG	VN-PR	H5N1	10 ⁶ ЭИД	20±10	98 ± 2
A/Vietnam/1203/2004 х A/Ленинград/134/17/57	VN-Len	H5N2	10 ⁶ ЭИД	95±5	94 ± 4
A/Vietnam/1203/2004 х A/чайка/Москва/3100/2006	VN-Gull	H5N2	10 ⁶ ЭИД	91±5	97 ± 2
A/курица/Курган/3654ат/2005 х A/Ленинград/134/17/57	Ku/at-Len	H5N2	10 ⁶ ЭИД	97 ± 3	95 ± 4
A/курица/Курган/3654ат/2005 х A/чайка/Москва/3100/2006	Ku/at-Gull	H5N2	10 ⁶ ЭИД	90±8	97 ± 2
A/Нью-Каледония х Ленинград/134/17/57	NC-Len	H1N1	10 ⁶ ЭИД	96±4	80 ± 20
Контроль (без иммунизации)			-	98±2	0

Примечание: Приводятся усредненные данные трех опытов. В каждой группе по 20 мышей. *% выживания мышей после вакцинации, **% выживания мышей после контрольного заражения вирусом A/курица/Курган/3/2005 в дозе 100 ЛД₅₀.

Однократное инфицирование любым из реассортантов с гемагглютинином H5 (табл. 1) приводит почти к 100 % защите от последующего контрольного заражения дозой 100 ЛД₅₀ вируса A/курица/Курган/3/2005 (H5N1). Оценка состояния мышей по изменению их веса (данные не приводятся) позволила отметить в этой группе мышей падение веса на 3-6 сутки с последующим выходом на исходный уровень. То есть, вакцинация не предотвращает инфицирование мышей, но облегчает течение заболевания.

Неожиданный эффект мы наблюдали в группе мышей, инфицированных живым гетерологичным вакцинным штаммом NC-Len (H1N1). В первые дни после контрольного заражения вирусом A/курица/Курган/3/2005 (H5N1) мыши теряли в весе так же быстро, как и контрольные. Но начиная с седьмого дня, ситуация резко изменилась и все уцелевшие к этому дню мыши, быстро набрали вес. Из чего можно заключить, что вакцинация живой гетерологичной вакциной H1N1 не предотвращает заболевание мышей при заражении вирусом H5N1, но защищает их от гибели, в то время как та же инактивированная вакцина в этом случае абсолютно бесполезна.

Аэрозольное инфицирование трехдневных цыплят породы изобраун реассортантами VN-Len, Ku/at-Len, VN-Gull и Ku/at-Gull в дозе 10⁵ ЭИД₅₀/цыпленка не вызвало клинических проявлений и отличий в прибавке веса от контрольных (интактных) цыплят (табл. 2).

На 3–4 сутки после заражения вирус в фекалиях не был обнаружен. На 14-ые сутки в крови цыплят определили уровень антител к HA/H5. Антитела присутствовали у всех цыплят, но в группах, вакцинированных VN-Gull и Ku/at-Gull, их титр был выше, чем в группах VN-Len и Ku/at-Len.

На 25-ые сутки после иммунизации провели контрольное заражение высоковирулентным вирусом H5N1 двумя способами: интраназально по 1000 ЭИД₅₀/цыпленка и аэрозольно по 100 ЭИД₅₀/цыпленка.

Во втором случае эффективность заражения была намного выше, так как при интраназальном заражении контрольные цыплята гибли на 3-4 день, а при аэрозольном – через 40-48 часов. Цыплята, вакцинированные VN-Gull и Ku/at-Gull, хорошо перенесли контрольное заражение в обоих случаях. С другой стороны, цыплята, вакцинированные холодоадаптированными реассортантами VN-Len и Ku/at-Len, перенесли интраназальное контрольное заражение вирусом A/курица/Курган/3/2005, но при аэрозольном заражении большинство из них погибло.

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

Таблиця 2 – Патогенність і протективність вірусних штаммов на цыплятах

Штамм	После вакцинации			Выживание после контрольного заражения	
	Вес*	Выж.**	АТ (lg)***	Ин.	Аэр.
VN-Len	135±13	9/9	2.4±0.5	7/8	1/8
VN-Gull	133±13	9/9	3.3±0.7	8/8	7/8
Ku/at-Len	137±12	9/9	2.3±0.5	8/8	2/8
Ku/at-Gull	130±19	9/9	3.2±0.7	8/8	8/8
Placebo	140±10	4/4	–	0/4	0/4

Примечание: Вес* – Средний вес цыплят, процент от исходной величины на 6-й день после вакцинации, Выж.** – Выживание: число выживших / число вакцинированных особей. АТ*** – lg от среднего геометрического титра антител к H5N1. Ин. – Интраназальное заражение вирусом А/курица/Курган/3/2005 (1000 ЭИД₅₀/цыпленка), Аэр. – Аэрозольное заражение вирусом А/курица/Курган/3/2005 (100 ЭИД₅₀/цыпленка)

Холодоадаптированные штаммы обычно не используют в качестве живых ветеринарных вакцин. Испытание на курах ряда холодоадаптированных и термочувствительных H5N1 вакцинных штаммов с внутренними генами от донора аттенуации американского происхождения A/Anp Arboг/6/60 оказалось безуспешным – вирус не приживался в дыхательных путях кур и не вызывал выработки антител [6]. Напротив, аналогичные штаммы с внутренними генами от донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 индуцируют выработку антител в организме кур; вероятно, за счет меньшей термочувствительности штамма A/Ленинград/134/17/57 по сравнению с A/Anp Arboг/6/60. Тем не менее, они обеспечивают защитный эффект только против интраназального введения высоковирулентного вируса, возможно, за счет местного клеточного и мукозального иммунитета.

Проведенные исследования показали, что экспериментальные вакцинные штаммы, сконструированные на базе природного апатогенного вируса А/чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), способны размножаться в легких цыплят, вызывают высокий уровень специфических антител и обеспечивают хорошую защиту от высоковирулентного H5N1 вируса А/курица/Курган/3/2005. Интересно, что у вирусов VN-Gull и Ku/at-Gull степень аттенуированности и иммуногенности совпадала. Это указывает на то, что аттенуирующий эффект мутаций в HA, понижающих рН конформационного перехода, равен эффекту удаления полиосновного сайта нарезания.

Вирус А/курица/Курган/3654ат/2005 х А/чайка/Москва/3100/2006 (Ku/at-Gull) сконструирован на основе двух вирусов российского происхождения без применения методов обратной генетики, то есть его использование не требует лицензирования. Апатогенность и высокий протективный эффект этого реассортанта позволяют рассматривать его в качестве кандидата на роль живой вакцины для кур.

Список литературы

1. Steel, J, Lowen, AC, Pena, L et al: Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza // J Virol. – 2009. – V.83. – P. 1742-1753.
2. Subbarao, K, Chen, H, Swayne, D et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. // Virology – 2003. – V.305. – P. 192-200.
3. Ломакина, Н.Ф., Гамбарян, А.С., Боравлева, Е.Ю., Кропоткина, Е.А., Кириллов, И.М., Ямникова С.С. Характеристика апатогенного вируса гриппа А/чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), выделенного в г. Москве. // Мол. генет. микробиол. и вирусол. – 2009. – Т.29. – С. 32-40.
4. Ломакина, Н.Ф., Боравлева, Е.Ю., Кропоткина, Е.А., Ямникова, С.С., Дрыгин, В.В., Гамбарян, А.С. Аттенуация вируса гриппа А/курица/Курган/3/2005 (H5N1) селекцией в условиях, имитирующих жизненный цикл вирусов диких уток. // Мол. генет. микробиол. и вирусол. – 2011-Принято к печати.
5. Ломакина Н.Ф., Кропоткина Е.А., Гамбарян А.С., Ямникова С.С. Использование ПЦР с дифференцирующими праймерами для определения генного состава реассортантов вируса гриппа А. // Ветеринарна медицина Украина, (Харьков). – 2007. Т.88. – С. 127-131.
6. Suguitan, AL Jr., McAuliffe, J, Mills, KL, et al. Live, Attenuated Influenza A H5N1 Candidate Vaccines Provide Broad Cross-Protection in Mice and Ferrets. // PLoS Med. – 2006. – V.3, №9. – P. 1541-1554.
7. Yen, H.-L., Guan, Y., Peiris, M., Webster, R.G. H5N1 in Asia / Monographs in Virology. Ed.: Klenk H.-D., Matrosovich M.N., Stech J. – 2008. – Vol. 27. – P.11-13.
8. Murphy, B. R., Sly, D. L., Tierney, E. L. et al. Reassortant virus derived from avian and human influenza A viruses is attenuated and immunogenic in monkeys // Science. – 1982. – Vol.218. – P. 1330-1332.

TESTING OF EXPERIMENTAL LIVE VACCINES AGAINST H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS IN COMPARISON WITH INACTIVATED VACCINES

Lomakina N.F.^{1,2}, Boravleva E.Y.¹, Kropotkina E.A.¹, Drygin V.V.³, Gambaryan A.S.¹

¹Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis named after M.P. Chumakov, RAMS, Moscow,

²All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after Ya.R. Kovalenko, RAAS, Moscow

³Federal Centre for Animal Health, Vladimir

Four experimental live vaccines based on two H5N1 influenza virus strains were constructed and tested; two of them had the hemagglutinin from the A/Vietnam/1203/04 strain lacking the polybasic HA cleavage site and two others had hemagglutinins from attenuated H5N1 virus A/Chicken/Kurgan/3/05 with amino acid substitutions of Asp54Asn and Lys222Thr in HA1, Val48Ile and Lys131Thr in HA2 and retained the polybasic HA cleavage site. The other genes of the experimental live attenuated vaccines were from the H2N2 cold adapted master strain A/Leningrad/134/17/57 (VN-Len and Ku/at-Len) or from the apathogenic H6N2 virus A/Gull/Moscow/3100/2006 (VN-Gull and Ku/at-Gull). All strains were apathogenic for mouse and chicken and conferred protection against challenge with H5N1 A/Chicken/Kurgan/3/05 infection 4 weeks after immunization. Immunization with heterologous live cold-adapted H1N1 vaccine reduced the mortality to near zero level, while inactivated H1N1 vaccines did not induce protection against challenge with H5N1 virus in mice.