

ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ДОСЛІДНИХ ЗРАЗКІВ ПОЛІВАЛЕНТНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ХВОРОБИ МАРЕКА З ВИДІЛЕНИХ МІСЦЕВИХ ШТАМІВ

Стегній М.Ю., Состін Д.Д., Стегній Б.Т., Зайцев Д.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

На сьогоднішній день хвороба Марека являє собою значну проблему для птахогосподарств у зв'язку з тим, що проведення якісної вакцинопрофілактики залишається відкритим питанням. На ринку України існує велика кількість вакцин закордонного виробництва, тому виготовлення ефективної вітчизняної вакцини з виділених місцевих штамів дуже актуальна задача.

У статті представлені результати досліджень імуногенних властивостей дослідних зразків полівалентної вакцини.

У лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ» з 2011 року було виділено шість та адаптовано до первинної культури клітин (ФЕК) п'ять польових ізолятів вірусу хвороби Марека (ВХМ). Визначено морфологію, культуральні властивості та інфекційну активність виділених ізолятів ВХМ. Шляхом клонування в первинній та перещеплюваній культурах клітин були отримані атенуовані, ареверсибельні ізоляти 3/11, 4/11 та 5/11 ВХМ першого серотипу.

Підібрано штами-компоненти вакцини проти ХМ на основі трьох серотипів герпесвірусу птиці. Виготовлено три дослідних зразка полівалентної вакцини проти ВХМ. Для виготовлення експериментальних зразків полівалентної культуральної вакцини проти ВХМ використовували виробничі штами герпесвірусу курей другого серотипу (штам SBG) і вірусу герпесу індичок (штам FC-126) третього серотипу та клоновані, атенуовані, ареверсибельні ізоляти 3/11, 4/11 та 5/11 вірусу хвороби Марека першого серотипу кожен окремо з двома виробничими штамами у щепних дозах, відповідно.

Ключові слова: ізолят, вірус хвороби Марека, імуногенна активність, полівалентна вакцина проти хвороби Марека, атенуовані ареверсибельні ізоляти вірусу хвороби Марека.

Хвороба Марека відноситься до найбільш небезпечних інфекційних хвороб курей. Це інфекційне, злоскісне, лімфопроліферативне захворювання птиці, яке має тенденцію до швидкого розповсюдження та завдає великі економічні збитки. Збудник цього захворювання — високопатогенний, клітинноасоційований альфа герпесвірус (Gallid herpesvirus), який є етіологічним агентом хвороби Марека (ХМ) [2, 3, 4, 6].

На цей час хвороба Марека набуває значного поширення у птахогосподарствах України, збитки від якої складаються з високої захворюваності (60 %), зниження продуктивності, вимушеного забою та загибелі курей [1].

Основним методом боротьби з цим захворюванням є вакцинопрофілактика. Вакцинація проти хвороби Марека супроводжується утворенням як клітинного, так і гуморального імунітету, який зберігається на протязі всього життя [1, 3, 5].

На сьогодні в багатьох країнах світу відмічено зниження захисних властивостей застосовуваних вакцин. Поясненням цьому є низька імуногенність вакцинного штаму герпесвірусу індичок, застосування вакцин на фоні материнського імунітету у курчат, а також появою високовірулентних патотипів збудника хвороби Марека [1].

У зв'язку з зазначеним, є доцільним використовувати полівалентні вакцини розроблені на основі місцевих виділених в Україні штамів вірусу хвороби Марека першого, другого (вірус герпесу курей) і третього (вірус герпесу індичок) серотипів.

В лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ» за період з 2011 року було виділено шість та адаптовано до первинної культури клітин (ФЕК) п'ять польових ізолятів вірусу хвороби Марека. Визначено морфологію, культуральні властивості та інфекційну активність виділених ізолятів ВХМ.

Підібрано найбільш адаптовані до культури клітин ізоляти для клонування. Найбільш адаптованими до культур клітин за культуральних властивостей та накопиченням у культурі клітин виявилися ізоляти 2/11–5/11.

За результатом клонування ізолятів ВХМ першого серотипу та удосконалення методики їх атенуації шляхом швидких і переважаючих пасажів у первинній (ФЕК) та перещеплюваній (CEF) культурах клітин отримано чотири атенуованих ізоляти ВХМ першого серотипу.

Атенуовані ізоляти 3/11, 4/11 та 5/11 ВХМ першого серотипу виявилися нешкідливими для піддослідних курчат, тому що не викликали ані загибелі, ані патологічних змін при їх розтині.

Отримані шляхом клонування за методом швидких і переважаючих пасажів у первинній та перещеплюваній культурах клітин атенуовані ізоляти: 3/11, 4/11 та 5/11 ВХМ першого серотипу мають задовільну імуногенну активність.

Підібрано штами-компоненти вакцини проти ХМ на основі трьох серотипів герпесвірусу птиці. Виготовлено три дослідних зразка трьохвалентної вакцини проти хвороби Марека. Для виготовлення експериментальних зразків полівалентної культуральної вакцини проти хвороби Марека використовували виробничі штами герпесвірусу курей другого серотипу (штам SBG) і вірусу герпесу індичок (штам FC-126) третього серотипу та клоновані, атенуовані, ареверсибельні ізоляти 3/11, 4/11 та 5/11 вірусу хвороби Марека першого серотипу кожен окремо з двома виробничими штамами у щепних дозах, відповідно.

Мета роботи – вивчити механізм дії дослідних зразків трьохвалентної вакцини на організм курчат та отримати достовірні дані щодо імуногенної активності цих зразків.

Матеріали та методи. Для випробування дослідних зразків трьохвалентної вакцини з використанням ізолятів вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11, 4/11, 5/11 на імуногенну активність було сформовано шість груп однодобових курчат по 20 голів у кожній:

- перша група — контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11;
- друга група — контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 4/11;
- третя група — контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 5/11;
- четверта група — контроль фізіологічного розвитку;
- п'ята група — контроль патогенності контрольного штаму першого серотипу JM;
- шоста група — контроль розріджувача.

Виготовлені три дослідні зразки вакцини склалися з двох виробничих штамів: вірусу герпесу курей (другого серотипу), вірусу герпесу індиків (третього серотипу) та одного з трьох атенуованих, ареверсифікабельних ізолятів вірусу хвороби Марека першого серотипу: 3/11, 4/11, 5/11 відповідно. Дослідні зразки вакцини були введені внутрішньом'язово відповідним групам курчат. Шостій групі (контроль розріджувача) було введено розріджувач внутрішньочеревно в об'ємі 0,2 см³/гол. З четвертою групою (контроль фізіологічного розвитку) та п'ятою групою (контроль патогенності контрольного штаму першого серотипу JM) ніяких маніпуляцій не проводили.

З метою вивчення напруженості імунітету через 21 добу, після введення дослідних зразків трьохвалентної вакцини, першій, другій, третій та п'ятій піддослідним групам курчат був введений штам-пробійник JM ВХМ першого серотипу внутрішньочеревно в об'ємі по 0,5 см³/гол.

За піддослідними групами курчат велось спостереження на протязі 128 діб. Результати дослідження враховувалися за збереженістю, фізіологічним розвитком піддослідних курчат і патологоанатомічними ураженнями органів, які були вивчені на розтині.

Результати досліджень. У процесі дослідження спостерігали неспецифічний відхід, у першу та другу добу спостереження, одногодвох курчат у кожній з груп, що допускається у перші дві доби після щеплення.

Після закінчення спостереження був проведений облік дослідження на імуногенність трьох зразків полівалентної вакцини проти хвороби Марека.

Результати обліку:

- перша дослідна група (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11) – залишилося 18 курчат;
- друга дослідна група (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 4/11) – залишилося 18 курчат;
- третя дослідна група (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 5/11) – залишилося 15 курчат;
- четверта група (контроль фізіологічного розвитку) – залишилося 18 курчат;
- п'ята група (контроль патогенності контрольного штаму першого серотипу JM) – залишилося 7 курчат;
- шоста група (контроль розріджувача) – залишилося 18 курчат.

З кожної групи було забито декілька голів курчат, з дотриманням міжнародних правил біоетики, з метою визначення наявності чи відсутності патологоанатомічних змін у внутрішніх органах.

При проведенні розтину у трьох курчат п'ятої групи (контроль патогенності контрольного штаму першого серотипу JM) були відмічені патологоанатомічні зміни у внутрішніх органах, характерні для хвороби Марека, а саме: потовщення стегового та сідничного нервів, наявність на внутрішніх органах крапкових салоподібних лімфом. У курчат цієї групи спостерігали пригнічення, вони значно відставали в рості та фізіологічному розвитку від контрольних і дослідних груп, з явними ознаками парезів і паралічу шиї і кінцівок.

У двох курчат першої групи (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11) спостерігали такі ознаки хвороби Марека як: парези та паралічі ніг. Під час розтину були відмічені розростання салоподібних новоутворень на внутрішніх органах і потовщення сідничного нерва.

У другій групі (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 4/11) з вісімнадцяти курчат у двох спостерігали кульгавість і паралічі ніг. У решти патологічних змін, характерних для хвороби Марека, не спостерігали.

У третій групі (контроль імуногенності дослідного зразка трьохвалентної вакцини з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 5/11) загинуло п'ять курчат, з них два курчати у перші дві доби і три у процесі дослідження (від переохолодження). Клінічних ознак і патологоанатомічних змін характерних для хвороби Марека не спостерігали в жодного курчати.

У четвертій (контроль фізіологічного розвитку) та шостій (контроль розріджувача) ознак хвороби Марека не спостерігали в жодній голові.

Визначена нешкідливість усіх трьох дослідних зразків трьохвалентної вакцини для однодобових курчат навіть у десятикратній щепній дозі, яка становила (100 %). Імуногенність дослідних зразків на рівні (88,9 %).

Висновки. Відсутність клінічних проявів хвороби Марека, фізіологічний розвиток у межах норми у піддослідних курчат третьої групи та відсутність патологоанатомічних змін у внутрішніх органах характерних для хвороби Марека в контролі та досліді засвідчує про те, що третій дослідний зразок (з використанням ізоляту вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 5/11) полівалентної вакцини володіє достатніми імуногенними властивостями. Неспецифічний відхід одного-двох курчат допускається в перші дві доби після щеплення. Загибель ще трьох курчат в процесі подальших досліджень, можна вважати неспецифічним відходом, тому що вона наступила в результаті переохолодження.

Таким чином, імуногенність дослідних зразків полівалентної вакцини виявилася у цілому на рівні (88,9%), що потребує збільшення імунізуючої дози в дослідних зразках вакцини.

Перспективи подальших досліджень. Результати досліджень, в яких вивчали імуногенні властивості трьох дослідних зразків полівалентної вакцини з використанням ізолятів вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11, 4/11, 5/11 засвідчують про те, що всі варіанти цих дослідних зразків володіють імуногенною активністю. Необхідно відпрацювати дози кожного з штамів-компонентів полівалентної вакцини для збільшення імуногенної активності.

Список літератури

1. Виготовлення та випробування імунологічних властивостей бівалентної вакцини проти хвороби Марека [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. мед. : міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 82. – С. 559-563.
2. Особенности репродукции вакцинных штаммов вируса болезни Марека [Текст] / Б. Т. Стегний [и др.] // Вет. мед. : міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 82. – С. 541-545.
3. Получение препаратов специфических антигенов и сывороток против вируса болезни Марека и их использование в иммуноферментном анализе [Текст] / М. А. Волкова [и др.] // Вет. патология – М., 2008. – № 2. – С. 2532.
4. Проблеми боротьби з хворобою Марека в Україні [Текст] / Б. Т. Стегній [та ін.] // Вет. мед.: міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2002. – Вип. 80. – С. 669-670.
5. DNA vaccine containing in infection against tumorigenic Marek's disease in chickens [Text] / B. K. Tischer [et al.] // Journal of General virology. – 2002. – vol. 22. – P. 2367-2376.
6. Witter, R. L. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus [Text] / R. L. Witter, I. M. Gimeno // Avian Dis. – 2006. – vol. 50, № 3. – P. 354-365.

DETERMINATION OF THE IMMUNOGENIC PROPERTIES OF PROTOTYPES MULTIVALENT VACCINES AGAINST MAREK'S DISEASE WITH A DEDICATED LOCAL STRAINS

Stegniy M.Yu., Sostin D.D., Stegnyy B.T., Zaitsev D.S.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Today Marek's disease is a significant problem for the poultry farms due to the fact that the quality of the vaccine remains open. In Ukraine there are many foreign vaccine production, so making effective domestic vaccine strains isolated local very urgent task.

The article presents the results of research prototypes immunogenic properties of multivalent vaccine.

In the laboratory, biotechnology NSC «IECVМ» for the period since 2011 has been allocated six and adapted to the primary culture cells (CEF) five field isolates of Marek's disease virus. Defined morphology, cultural characteristics and infectivity of isolates MDV. By cloning in primary and transplantable cell cultures were obtained attenuated, reversible isolates 3/11, 4/11 and 5/11 Marek's disease virus of a first serotype.

Selected strains of the vaccine components against MD on the basis of the three serotypes of herpesvirus birds. Produced three prototype multivalent vaccine against Marek's disease. For the manufacture of experimental samples multivalent cultural vaccine against Marek's disease used production strains herpesvirus chickens of the second serotype (strain SBG) and herpes virus of turkeys (strain FC-126) third serotype and cloned, attenuated, reversible isolates 3/11, 4/11 and 5/11 of Marek's disease virus of a first serotype each separately with two production strains in the vaccination doses, respectively.

Keywords: isolate, Marek's disease virus, immunogenic activite, polyvalent vaccine against Marek's disease, attenuated reversible isolates of Marek's disease virus.