

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ЭМЕРДЖЕНТНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ В УКРАИНЕ**Стегний Б.Т., Музыка Д.В., Стегний А.Б.***Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков***Бисюк И.Ю.***Государственная ветеринарная и фитосанитарная служба Украины, г. Киев*

Безопасность сельскохозяйственной продукции, а также продуктов питания является важным вопросом эпизоотического благополучия для многих стран. В последние годы в мире произошел целый ряд серьезных вспышек особо опасных заболеваний сельскохозяйственных животных (ящур, высокопатогенный грипп птицы и т.п.), а также заболеваний людей, вызванных кишечной палочкой, сальмонеллой и SARS. В новом тысячелетии происходит интеграция и объединение сельского хозяйства и пищевой промышленности, поэтому особую актуальность приобретают вопросы безопасности продуктов питания человека и связанные с этим смежные проблемы (эпизоотическое благополучие, здоровье животных).

На сегодняшний день вакцинопрофилактика имеет ключевое место в системе мероприятий борьбы с особо опасными заболеваниями животных и птиц. Научными сотрудниками разных стран мира за последние 50 лет разработано колоссальное количество вакцин для профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц, в том числе и особо опасных, таких как ящур и др.

За последние 7 лет значительно ухудшилась эпизоотическая ситуация в мире относительно высокопатогенного гриппа птиц, в первую очередь в Юго-Восточной Азии [1]. В Советском Союзе вспышки гриппа птиц были зарегистрированы в 60-70 годах прошлого века в некоторых регионах европейской части. Начиная с 1992 года Украина и Российская Федерация были благополучны относительно гриппа [2]. С 2005 года вспышки этого опасного заболевания были зарегистрированы в России и Украине. Огромные экономические убытки, опасность для человека привлекли к этому заболеванию особое внимание не только научных учреждений и ветеринарных служб многих стран, но и международных организаций, органов государственной власти.

В борьбе с гриппом птиц определенная роль может принадлежать специфической профилактике с применением вакцин. Поэтому разработке соответствующих биологических препаратов в развитых странах уделялось и уделяется большое внимание. Необходимо указать, что в 70-тые годы прошлого века в Советском Союзе сотрудниками Научно-исследовательского института ветеринарной микробиологии и вирусологии была разработана промышленная технология изготовления инактивированной вакцины против гриппа птиц, производство которой было налажено на Приволжской биофабрике. В дальнейшем было разработано еще две экспериментальные инактивированные вакцины на основе вируса гриппа подтипа H5N2 (масляная и сорбированная на основе ГОА), которые с положительным результатом были испытаны на птице [2]. В последние годы научные исследования относительно разработки средств специфической профилактики гриппа птиц в Российской Федерации проводились в нескольких научных учреждениях (ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте птицеводства совместно с Научно-исследовательским институтом гриппа) [2, 3].

Начиная с 1959 года в мире произошло 29 эпизоотий высокопатогенного гриппа птиц, который был вызван вирусами подтипов H5 и H7. Самая большая из этих эпизоотий поразила больше стран и привела к гибели большего количества птицы чем все остальные 28. Эта эпизоотия вызванная вирусом высокопатогенного гриппа H5N1 началась в провинции Гуандонг в Китае в 1996 году. В результате погибло и было уничтожено более 250 миллионов домашних и диких птиц в 63 странах за последние 16 лет. Большинство стран в качестве мер контроля, борьбы и эрадикации этого заболевания использовали стемпинг-аут. Из общего числа пострадавших от гриппа стран, 15 в качестве стратегии контроля использовали вакцинацию. В общей сложности в этих странах было использовано более 113 миллиардов доз вакцины в период с 2002 по 2010 годы. Некоторые страны, такие как Монголия, Казахстан, Франция, Нидерланды, Кот Дивуар, Судан, Северная Корея, Израиль, Россия и Пакистан использовали стратегию целевой иммунизации или емерджентной вакцинации, для чего было использовано менее 1% от общего мирового количества доз вакцины. В 5 странах была развернута национальная программа вакцинации против высокопатогенного гриппа птиц. В этих странах и было использовано 99 % вакцин против гриппа (Китай 90,9 %, Египет (4,6 %), Индонезия (2,3 %), Вьетнам (1,4 %), Гонконг (менее 0,01 %)). В 95,5 % случаев были использованы инактивированные вакцины и только в 4,5 % использовали живые рекомбинантные вакцины. Шесть стран на сегодняшний день являются стационарно неблагополучными по высокопатогенному гриппу H5N1 и имеют постоянные очаги этой инфекции. Некоторые из них, такие как Китай, Индонезия, Египет использовали вакцинацию после начала распространения инфекции. Некоторые страны (Бангладеш, восточная Индия), являясь стационарно неблагополучными, не используют вакцинацию для контроля заболевания. Использование вакцинации обеспечило защиту птицы от клинической болезни и гибели в период вспышек. Однако, в некоторых вакцинированных стадах регистрировались вспышки гриппа как результат неправильной вакцинации или несоответствующей административной стратегии. Кроме того, в некоторых странах (Мексике, Китае, Индонезии, Гонконге и Вьетнаме) наблюдался антигенный дрейф полевых вирусов высокопатогенного гриппа H5N1 как результат давления классического вакцинного штамма [4]. Таким образом вопрос применения вакцин для контроля высокопатогенного гриппа остается открытым и требует дальнейших научных исследований. Украина также принимала участие в разработке средств специфической профилактики и контроля высокопатогенного гриппа птиц.

В нашей стране проблемой высокопатогенного гриппа птиц в последние годы занималось несколько учреждений, но ведущая роль принадлежит ННЦ «ИЭКВМ» с сетью 3-х опытных станций (Крымской, Одесской, Днепрпетровской). Специалисты ННЦ «ИЭКВМ» выделили возбудителя высокопатогенного гриппа птиц на территории Украины, провели его идентификацию и дальнейшее изучение биологических свойств, а также разработку, доклинические, клинические, межлабораторные комиссионные и производственные испытания вакцин.

На сегодняшний день научные сотрудники ННЦ «ИЭКВМ» создали целый ряд отечественных инактивированных вакцин против высокопатогенного гриппа птиц: гомологичная инактивированная эмульсированная вакцина против высокопатогенного гриппа птиц «АвиФлуВак-IEKBM», ассоциированная инактивированная вакцина против высокопатогенного гриппа птиц и ньюкаслской

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунологічних препаратів

болезни, бивалентная инактивированная вакцина против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H5 и H7, трехвалентная инактивированная вакцина против гриппа подтипов H5, H7 и болезни Ньюкасла.

Для создания отечественной вакцины «АвиФлуВак-ІЕКВМ» был избран эпизоотический гомологический штамм А/курка/Сиваш/02/05 H5N1, который был изолирован во время вспышки высокопатогенного гриппа птиц в АР Крым в 2005 году. Путем селективного клонирования на СПФ куриных эмбрионах, культурах клеток и путем подбора условий культивирования был получен производственный штамм вируса А/курица/Сиваш/02/05 H5N1, который обеспечивал высокое качество вирусного сырья с высоким титром гемагглютининов $10-12 \log_2$. Производственный штамм депонирован в Государственном научно-контрольном институте биотехнологии и штаммов микроорганизмов под № 383. На производственный штамм получен патент Украины № 20245. Следующим этапом был подбор инактиванта и регламента инактивации, которые обеспечивали полную инактивацию инфекционных свойств вируса и не влияли на антигенные и иммуногенные характеристики вируса. Нами было проведено испытание различных адьювантов, подбор оптимальных соотношений антигенов, режимов эмульгирования. По разработанной технологии было изготовлено несколько серий вакцины для проведения лабораторных доклинических опытов, в которых были изучены антигенные свойства, определена оптимальная доза вакцины для разных видов сельскохозяйственной птицы. Установлено, что доза для кур составляет $0,5 \text{ см}^3$, для уток – $1,0 \text{ см}^3$, гусей – $2,0 \text{ см}^3$, индюков – $1,0 \text{ см}^3$. Также был определен срок хранения вакцины, который составляет 12 месяцев со дня изготовления.

Вакцина «АвиФлуВак-ІЕКВМ» прошла государственные комиссионные испытания на Херсонской государственной биологической фабрике, а производственные испытания в одном из населенных пунктов Херсонской области. Контроль качества вакцины проводился согласно требованиям МЕМ и Государственного научно-контрольного института штаммов микроорганизмов. По всем показателям (внешний вид, цвет, вязкость, отсутствие посторонних примесей, стабильность эмульсии, остаточное количество инактиванта) вакцина отвечала международным стандартам. Особое внимание было уделено полноте инактивации вируса, безвредности, антигенным и иммуногенным свойствам вакцины. По результатам испытаний было установлено, что при введении птице двукратной дозы не наблюдалось клинических проявлений заболевания и местной реакции в месте введения биопрепарата. При определении антигенных свойств установлено, что иммунизация вызывает у сельскохозяйственной птицы формирование стойкого напряженного иммунитета. Уже через 21 день после однократного введения вакцины титр антител у кур к вирусу составлял $6,30 \pm 0,42-6,80 \pm 1,88 \log_2$, в реакции задержки гемагглютинации, а после ревакцинации с интервалом 3 недели средний титр антител достигал $9,25-11,40 \log_2$. Уровень антител у уток, гусей и индюков после ревакцинации составлял соответственно $6,6 \pm 2,06 \log_2$; $6,4 \pm 0,89 \log_2$ и $7,5 \pm 0,57 \log_2$.

Иммуногенная активность вакцины «АвиФлуВак-ІЕКВМ» была проверена во время лабораторных и производственных испытаний путем прямого инфицирования высокопатогенным контрольным вирусом. Для опыта было сформировано две группы цыплят: опытная (вакцинированные цыплята) и контрольная (не вакцинированные). Через 4 недели после ревакцинации цыплята опытной группы и не вакцинированные из контрольной группы были заражены вирулентным вирусом. Ежедневно на протяжении 7 суток от опытных и контрольных цыплят отбирались клоакальные смывы для определения вирусыведения. Через 36-40 часов все контрольные (не вакцинированные) цыплята погибли с клиническими проявлениями заболевания. С клоакальных смывов этой группы было реизолировано возбудителя. В то же время все вакцинированные цыплята на протяжении 14 суток (период наблюдения) оставались клинически здоровыми и на протяжении 7 суток вирус не выделялся в окружающую среду.

По результатам испытаний инактивированная эмульсированная вакцина против высокопатогенного гриппа птицы «АвиФлуВак-ІЕКВМ» была признана безопасной, безвредной для птицы и рекомендована для использования в практике ветеринарной медицины. На вакцину «АвиФлуВак-ІЕКВМ» разработана нормативная документация ТУ В 24.4-00497087-041:2006, инструкция по изготовлению и контролю. Вакцина зарегистрирована в Украине (регистрационное удостоверение № 2297-04-0267-06 от 26.12.2006).

Для изготовления ассоциированной инактивированной эмульсированной вакцины против высокопатогенного гриппа и ньюкаслской болезни был использован производственный штамм вируса гриппа А/курица/Сиваш/02/05 и эпизоотический штамм вируса ньюкаслской болезни «ЛГ-85». На основе экспериментальных данных были определены схемы и дозы введения вакцины для различных видов сельскохозяйственной птицы, изучены особенности формирования специфического иммунитета, его длительность, напряженность. Установлено, что длительность напряженного иммунитета у кур к вирусу гриппа и болезни Ньюкасла составила 300 дней при титрах антител от $9,22 \pm 1,09 \log_2$ до $5,06 \pm 0,54 \log_2$ и от $12,5 \pm 1,01 \log_2$ до $6,80 \pm 0,83 \log_2$ соответственно. У уток и гусей – 150-180 суток, а уровень антител был соответственно от $7,40 \pm 1,50 \log_2$ до $5,28 \pm 0,48 \log_2$ и от $7,30 \pm 1,49$ до $6,28 \pm 1,38 \log_2$. У индеек длительность иммунитета оставила 180-240 суток, уровень антител от $6,38 \pm 1,75 \log_2$ до $5,50 \pm 1,0 \log_2$ и от $6,28 \pm 2,01 \log_2$ до $5,00 \pm 0 \log_2$ к вирусу гриппа и болезни Ньюкасла соответственно. На инактивированную ассоциированную эмульсированную вакцину против птичьего гриппа и ньюкаслской болезни получен декларационный патент Украины № 25751 от 27.08.2007 года.

При разработке технологии изготовления инактивированной бивалентной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H5 и H7 было изготовлено несколько экспериментальных серий вакцины с различным соотношением антигенов и их активностью. По результатам проведенных исследований установлено, что после двукратной вакцинации уровень антител к вирусу гриппа H5 и H7 у кур составил соответственно $6,5-9,0 \log_2$ и $6,67-8,3 \log_2$ при длительности иммунитета 180 дней (срок наблюдения), у уток – $6,7-8,1 \log_2$ и $6,1-7,8 \log_2$ при длительности 90 суток (срок наблюдения), а у индеек – $5,5-6,67 \log_2$ и $5,75-6,75 \log_2$ при длительности иммунитета 180 дней (срок наблюдения).

Значительные исследования были проведены по изучению антигенных свойств экспериментальных образцов инактивированной вакцины против гриппа птиц H5, H7 и болезни Ньюкасла с разным соотношением антигенов и их активностью. Установлено, что введение вакцины курам вызывало у них наработку специфических антител к вирусу гриппа H5 в титрах $5,5-6,64 \log_2$, к вирусу гриппа H7 – $3,88-4,08 \log_2$, вирусу болезни Ньюкасла – $6,21-7,50 \log_2$.

Выводы. Таким образом, Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» – ведущее научное учреждение Украины, который обеспечивает научное сопровождение проблем особо опасных инфекционных заболеваний животных и птицы. Основные научные исследования направлены на разработку отечественных средств специфической профилактики этих заболеваний. На сегодняшний день научными сотрудниками ННЦ «ІЭКВМ» разработаны 4 вакцины для специфической профилактики высокопатогенного гриппа и ньюкаслской болезни. Не смотря на то, что в Украине

вакцинация сельскохозяйственной птицы против гриппа птиц не проводится, специалисты ННЦ «ИЭКВМ» не останавливаются на достигнутом и продолжают работу в направлении поиска новых штаммов и разработки современных технологий изготовления высокоэффективных средств специфической профилактики эмерджентных инфекций птицы.

Список литературы

1. Государственный комитет ветеринарной медицины [Елeктор. ресурс] / Способ доступа: <http://www.vet.org.ua> – Заголовок с экрана. 2. Борисов, А.В., Борисов, В.В., Ирза, В.Н., Рахманов, А.М. Научно-правовое обеспечение мероприятий по борьбе с высокопатогенным гриппом птиц/Труды Федерального центра охраны здоровья животных/ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)-Т.5.-Владимир: Издательство ООО «Транзит-икс», 2007.-С.83-93. 3. Грипп А птиц: проблемы и пути их решения. Санкт-Петербург - Ломоносов, 2006.- 201 с. 4. David, E. Swayne. Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza 8th International Symposium on Avian Influenza, Royal Holloway, University of London, UK P.19

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGIES FOR PRODUCTION OF INACTIVATED VACCINES AGAINST AVIAN EMERGENT DISEASES IN UKRAINE

Stegniy B.T., Muzyka D.V., Stegnyy A.B.

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

Bisyuk I.Yu.

State Veterinary and Phytosanitary Service of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Ensure of epizootic environment in Ukraine is the main objective of Veterinary Medicine. The task of science - is the development of modern highly specific means of prevention of infectious diseases, especially relevant for dangerous diseases of animals and poultry. National Science Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine" is the leading veterinary research institution in the field of veterinary medicine, which provides scientific support for a range of veterinary problems, including on the development of specific prevention. Specialists of NSC "IECVM" had developed a number of domestic vaccine against highly dangerous viral diseases of poultry such as the highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease. These preparations have not only been laboratory tested, and proven effective during production testing. This article is devoted to the development of biologic preparations.

УДК 619:616.085.371 571.56

ИСПЫТАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ С ИММУНОМОДУЛЯТОРОМ В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Тихонова Ф.М., Неустроев М.П., Петрова С.Г., Баишев А.А.

ГНУ Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, г. Якутск

Табунное коневодство является одной из основных и перспективных отраслей сельского хозяйства Республики Саха (Якутия). В последние годы, по данным Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по РС (Я), общее количество лошадей во всех категориях сельскохозяйственных предприятий республики увеличилось, однако, процент делового выхода жеребят остается низким, т.е. не превышает 56 %. Причинами аборт и прохолостения кобыл являются инфекционные заболевания, которые причиняют большой экономический ущерб коневодству. Из них наиболее распространенным является ринопневмония лошадей (вирусный аборт лошадей), которая регистрируется почти во всех регионах России, в том числе и в Республике Саха (Якутия) [1, 2, 3, 4].

С 2002-2011 гг. в Республике Саха (Якутия) отмечено около 100, неблагополучных по ринопневмонии лошадей, пунктов в Амгинском, Верхоянском, Кобяйском, Мегино-Кангаласском, Нюрбинском, Оймьяконском, Сунтарском, Средне-Колымском, Таттинском, Томпонском, Усть-Алданском, Хангаласском, Чурапчинском районах и в пригороде г. Якутска, занимающихся табунным коневодством.

В связи с этим, поиск экологически безвредных, экономически обоснованных и эффективных средств и методов иммунопрофилактики ринопневмонии лошадей в табунном коневодстве остается актуальной проблемой ветеринарной науки и практики.

Цель работы. Целью данных исследований является испытание вакцины против ринопневмонии лошадей инактивированной с иммуномодулятором в производственных условиях.

Материалы и методы. Вакцина против ринопневмонии лошадей инактивированная с иммуномодулятором изготовлена из авирулентного штамма СВ/69 вируса ринопневмонии лошадей (совместно с отделом вирусологии ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, г. Москва). В каждой дозе вакцины содержится 5,5-6,0 lg ТЦД₅₀ убитого вируса вакцинного штамма. В качестве иммуномодулятора использована культуральная жидкость из штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3. Установлена безвредность вакцины на лабораторных животных.

Производственные испытания вакцины против ринопневмонии лошадей инактивированной с иммуномодулятором проведены в 2010-2011 гг. в неблагополучном по ринопневмонии лошадей хозяйстве Амгинского района с. Болугур СХПК «Болугур», согласно «Временному наставлению по применению вакцины против ринопневмонии лошадей инактивированной с иммуномодулятором», утвержденному директором ГНУ Якутский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии от 21 октября 2008 г.

Перед иммунизацией проводили клинический осмотр жеребых кобыл и дегельминтизацию препаратом «Ивермек». Вакцинацию проводили после отъема жеребят в первой декаде декабря месяца. Вакцину вводили внутримышечно в область верхней трети шеи в дозе 3 мл, согласно временной инструкции по применению. Клиническое состояние кобыл контролировали в течение 5 месяцев.

Для постановки производственного испытания вакцины сформировано 2 группы:

1 группа: кобылы (n = 106) иммунизированы вакциной против ринопневмонии лошадей инактивированной с иммуномодулятором, согласно временной инструкции по применению;

2 группа: контрольная группа (n = 42), которую составили клинически здоровые непривитые животные неблагополучного хозяйства по ринопневмонии лошадей.

Взятие крови проводили до вакцинации и через 6 месяцев, т.е. после выжеребки. При повторном взятии кровь брали от кобыл и жеребят.

Специфические антитела к антигенам вируса ринопневмонии выявляли иммуноферментным анализом, биохимические исследования проводили в лаборатории биохимии и массового анализа ГНУ Якутский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии инфракрасным анализатором (NIR scanner model 4250).

Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.