

УДК: 619:616.98:578.82/.83:615.371:636.5

**КЛІНІЧНЕ ВИПРОБУВАННЯ 4-Х ВАЛЕНТНОЇ АСОЦІЙОВАНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ
ВАКЦИНИ ПРОТИ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ, ІНФЕКЦІЙНОГО
БРОНХІТУ КУРЕЙ, ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ
ТА СИНДРОМУ ЗНИЖЕННЯ НЕСУЧОСТІ РОЗРОБКИ ННЦ «ІЕКВМ»**

Стегній Б. Т., Кошелєв В. В., Музика Д. В., Стегній А. Б., Рула О. М., Ткаченко С. В.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Богач М. В., Богач Т. В., Пчелінська Л. В., Степанова Н. О.
Одеська дослідна станція Національного наукового центру «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», м. Одеса, Україна

Кузьмич Г. С.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна

У статті наведені дані проведення клінічного випробування біопрепарату «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина асоційована інактивована проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості» розробки Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Встановлено, що вакцина є високоімуногенним, антигенно активним препаратом. Застосування її в системі профілактичних заходів дозволить значно знизити кількість захворювань птиці щодо ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості, а також домогтися епізоотичного благополуччя в птахівничих господарствах України.

Ключові слова: вакцина, ньюкаслська хвороба, інфекційний бронхіт курей, інфекційна бурсальна хвороба, синдром зниження несучості, сироватки крові, сільськогосподарська птиця

На сьогоднішній день проблема безпеки та благополуччя птахівничих господарств різних форм власності України щодо вірусних хвороб залишається актуальною. Інфекційні захворювання сільськогосподарської птиці суттєво впливають на ефективне ведення птахівництва, санітарно-гігієнічні показники продукції, що отримуємо. Сучасне промислове птахівництво все більш стає орієнтоване та спрямоване на постійний ріст обсягів випуску продукції, збільшення щільності птиці на одиницю площі, зменшення витрат на утримання поголів'я і годівлю. У таких умовах на птицю впливає велика кількість стрес-факторів, а економічно значущі вірусні інфекції, такі як давно відомі і добре вивчені збудники ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей, інфекційної бурсальної хвороби, синдрому зниження несучості можуть проявляти себе неспецифічно [1, 2, 3, 4, 5].

Ефективність попередження ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей, інфекційної бурсальної хвороби та синдрому зниження несучості в усьому світі пов'язують, головним чином, з застосуванням живих та інактивованих вакцин. При цьому вакцинопрофілактика до останнього часу залишається єдиним ефективним діючим методом для профілактики інфекційних хвороб при великомасштабному вирощуванні птиці.

Кожен тип вакцин, який використовується для специфічної профілактики вищевказаних захворювань у птахів, має переваги і недоліки. Перевага живих вакцин полягає в технологічності і в можливості використання масових методів застосування при вакцинації. До недоліків живих вакцин належать формування нестабільної імунної реакції у птиці, розвиток різного роду ускладнень, таких, як підвищена реактогенність, розвиток імуносупресії, а іноді й загибелі птиці при впливі несприятливих умов утримання і наявності супутніх інфекцій, а також можливі проблеми відтворення, тривала персистенція і виділення вакцинного вірусу в зовнішнє середовище [6].

У промислового птахівництві широке застосування знайшли сорбовані на гідроокису алюмінію або масляні на основі емульсії зворотного типу інактивовані вакцини, що володіють істотними перевагами в порівнянні з живими вакцинними препаратами. Перш за все, слід зазначити їх високу безпеку і нешкідливість, можливість стандартизації дозованого введення специфічного антигену, стабільність основних біологічних властивостей, можливість створення системної, напруженої і тривалої імунної відповіді [7].

Епізоотичний процес вірусних інфекцій лише у виняткових випадках (надзвичайні епізоотичні ситуації) перебігає у вигляді моноінфекцій, частіше за все захворювання несуть асоціативний перебіг. До переваг асоційованих препаратів перед моновалентними варіантами можна віднести зниження дії стресових чинників на птицю при проведенні масових вакцинацій, зменшення при цьому трудовитрат, можливість змінювати антигенний склад асоційованих вакцин залежно від конкретної ситуації на окремих птахофабриках, тобто, з врахуванням вимог замовника [8, 9, 10, 11, 12].

Тому на сьогодні для промислового птахівництва дуже важливим є своєчасний та комплексний підхід щодо профілактики інфекційних хвороб птиці, а саме ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей, інфекційної бурсальної хвороби, синдрому зниження несучості шляхом розробки та впровадження у виробництво більш ефективних засобів захисту птиці, використання полівалентних вакцинних препаратів з епізоотично актуальними штамми для території України, використання продукції власного виробництва.

Мета роботи: провести клінічні випробування біопрепарату «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина асоційована інактивована проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості» та визначити антигенну активність та безпечність для птиці.

Матеріали та методи. Клінічні випробування біопрепарату АвіВак-ІЕКВМ-2 проводили за наступними показниками: зовнішній вигляд, колір; наявність цвілі, сторонніх домішок, тріщин флаконів, слідів відтаювання; контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою; повнота інактивації (9–11-добові SPF-ембріони курей; 11-добові ембріони качок); нешкідливість (курчата віком 90–120 діб); антигенна активність (курчата віком 90–120 діб); стабільність емульсії.

Визначення антигенних властивостей компонентів вакцини починали з вивчення інфекційної активності штамів, що входять до її складу. Для цього проводили титрацію вірусів (розведення від 10^{-1} до 10^{-12} на ФСБ з додавання антибіотиків) НХ, ІБВ та ІБК на SPF-КЕ (курчачі ембріони вільні від патогенної флори), а вірусу СЗН–на качиних ембріонах (КачЕ), отриманих від батьківського стада, благополучного з інфекційних захворювань. Отримані розведення витримували за кімнатної температури впродовж 30 хвилин. На кожне розведення брали не менше 4 ембріонів. Інфікування SPF-КЕ здійснювали згідно за загальноприйнятих методик [16, 17]. Інфекційну активність вірусу визначали за формулою Ріда та Менча (EID_{50}/cm^3).

Стабільність емульсії визначали шляхом відбору із загального пулу двох проб об'ємом по 10 см^3 у спеціальні градуйовані пробірки. Емульсію центрифугували за 2,5–3 тис. обертів на хвилину протягом 30 хвилин, а потім зберігали у термостаті за температури $37\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 7 діб.

Визначення антигенних властивостей компонентів вакцини проводили шляхом імунізації птиці на Одеській дослідній станції ННЦ «ІЕКВМ». Птицю розподілили на 2 групи та поставили криломітки: дослідна група (10 голів) та контрольна група (5 голів). Експериментальними зразками «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина асоційована інактивована проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості» провели імунізацію курчат 93-х добового віку породи Адлерівська срібляста в грудний м'яз у дозі $0,5\text{ см}^3$. Рівень антитіл в сироватках крові дослідних курей визначали: до імунізації, на 7, 14, 21, 28 добу, а потім кожні 30 діб протягом 6 місяців в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) для вірусів НХ та СЗН, імуноферментному аналізі (ІФА) – для вірусів ІБХ та ІБК [13, 14, 15].

Нешкідливість «АвіВак-ІЕКВМ-2» визначали шляхом спостереження впродовж 30 діб після щеплення вакциною 10 голів ремонтного молодняку курей (93 доби) внутрішньом'язево (у грудний м'яз) в об'ємі двох імунізуючих доз – $1,0\text{ см}^3$. Потім проводили щоденний огляд на предмет виявлення змін на місці введення вакцини та загального стану.

Результати досліджень. При визначенні інфекційної активності вірусів ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості отримали наступні результати: для вірусу НХ штаму «|La-Sota» вона становила $11,36\text{ EID}_{50}/0,2\text{cm}^3$; для ІБК штаму «H-52» – $8,23\text{ EID}_{50}/0,2\text{cm}^3$; для ІБХ штаму «Kharkiv`12» – $8,37\text{ EID}_{50}/0,2\text{cm}^3$ та для СЗН штаму «Crimea`07» – $9,0\text{ EID}_{50}/0,2\text{cm}^3$. Віруси ІБХ та ІБК не мали аглютинуючої активності, віруси НХ та СЗН аглютинували 1 % суспензію еритроцитів півня в розведеннях 1:32768 та 1:65536 відповідно. Відсутність контамінації сторонніми вірусами було підтверджено в ПЛР, а відсутність контамінації бактеріальною мікрофлорою – шляхом висіву на живильні середовища. За результатами випробувань одержані свідоцтва, до кожного штаму, про первісне депонування штамів мікроорганізмів в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Встановлено, що біопрепарат «АвіВак-ІЕКВМ-2», згідно вимог, однорідна стабільна емульсія білого кольору, без цвілі, сторонніх домішок, вільна від бактеріальної та грибової флори.

При проведенні контролю повноти інактивації вірусів ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості в трьох послідовних «сліпих» пасажах на 9-добових курячих ембріонах та вірусу синдрому зниження несучості – на 10-добових качиних ембріонах, за час спостереження загибелі ембріонів та патологічних змін не виявлено. Аглютинація еритроцитів була відсутня.

Результати досліджень титрів антитіл до і після вакцинації по кожному з антигенних компонентів приведені в таблицях 1 та 2.

Встановлено, що вакцина має високу антигенну активність відносно вірусу НХ, на 14 добу специфічні титри антитіл сягали $7,6\pm 0,699$. Далі рівень антитіл підвищувався і на 28 добу складав $8,6\pm 1,075$, що в кілька разів вище мінімальної протективної дози.

Також вакцина володіє високою антигеною відносно вірусу ІБХ, це підтверджується тим, що специфічні антитіла вже на 7 добу були виявлені у високому титрі (6457 ± 1682), на 21 добу рівень антитіл досяг свого максимуму і склав (11299 ± 1722), а на 28 добу він трохи знизився і склав (9979 ± 2093).

Вакцина має високу антигенну активність відносно вірусу ІБК. Інактивований компонент вакцини на 7 добу викликав утворення протективного титру антитіл, що складав (1838 ± 1345), а на 28 добу він досяг (6737 ± 2058).

Таблиця 1 – Результати наявності антитіл у сироватках крові курей до вакцинації

Антигенний компонент	Фактичні титри
НХ	АТ відсутні
ІБХ	$1722\pm 909,1$
ІБК	$850\pm 482,9$
СЗН	АТ відсутні

Таблиця 2 – Результати РЗГА щодо наявності антитіл у сироватках крові імунізованих курей до вірусів ньюкаслської хвороби та синдрому зниження несучості

Антигенний компонент	Фактичні титри (\log_2), доба спостережень			
	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
НХ	0,9±0,875	7,6±0,699	8,2±0,789	8,6±1,075
Контроль	0,8±0,114	0,8±0,114	0,4±0,194	1,6±0,894
СЗН	0	16±8	64±32	64±32
Контроль	0	0	0	0

Таблиця 3 – Результати ІФА щодо наявності антитіл у сироватках крові імунізованих курей до вірусів інфекційної бурсальної хвороби та інфекційного бронхіту курей

Антигенний компонент	Фактичні титри, доба спостережень			
	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
ІБХ	6457±1682	9000±956,4	11299±1722	9979±2093
Контроль	1831,2±746,27	1849,8±1079,62	2298,4±1391,71	1535,8±846,75
ІБК	1838±1345	5832±2354	6451±2463	6737±2058
Контроль	657,6±297,91	858,4±302,17	963±958,87	786,2±331,81

Стосовно вірусу СЗН встановлено, що вакцина володіє високою антигенною активністю відносно нього. Так на 14 добу титр специфічних антитіл складав (16±8), а через 28 днів після імунізації досяг рівня (64±32).

У підсумку, за результатами проведення клінічного випробування біопрепарату «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина асоційована інактивована проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості», компоненти вакцини викликали формування титрів антитіл, які значно перевищували мінімальні захисні титри, що забезпечують стійкий протективний захист від зазначених інфекцій. Спостереження впродовж 30 днів після щеплення вакциною 10 голів ремонтного молодняка курей внутрішньом'язево в об'ємі двох імунізуючих доз – 1,0 см³ довели нешкідливість препарату - кури були живими та клінічно здоровими, при розтині в місці введення вакцини запальних процесів не було.

Висновки. 1. За результатами випробувань інфекційна активність вірусів НХ («|La-Sota»), ІБК («Н-52»), ІБХ («Kharkiv`12») та СЗН («Crimea`07») становила 11,36 EID50/_{0,2см3}; 8,23 EID50/_{0,2см3}; 8,37 EID50/_{0,2см3} та 9,0 EID50/_{0,2см3} відповідно.

2. Проведена імунізація 93-х добових курей експериментальними зразками 4-х валентної вакцини «АвіПоліВак-2» (вакцина асоційована інактивована проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей, синдрому зниження несучості).

3. Біопрепарат «АвіВак-ІЕКВМ-2 – вакцина проти ньюкаслської хвороби, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості», розроблений та виготовлений у Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за показниками якості відповідає вимогам ТУ і в чинному порядку може бути запропонованим для впровадження у практику ветеринарної медицини.

Список літератури

1. C. B. Nelson, B. S. Pomeroy, Katherine Schroll, W. E. Park, R. J. Lindeman. An Outbreak of Conjunctivitis Due to Newcastle Disease Virus (NDV) Occurring in Poultry Workers (англ.). National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
2. Головний державний інспектор ветеринарної медицини України. Наказ «Про затвердження інструкцій про заходи з профілактики та ліквідації інфекційного бронхіту курей, інфекційного ларинготрахеїту птахів, хвороби Марек у курей, Інструкції про заходи боротьби з грипом птиці (Інструкція про заходи з профілактики та ліквідації інфекційного бронхіту курей)», N 78 від 17.10.2001.
3. Egg Drop Syndrome (EDS) bij leghennen vastgesteld, Veterinair, juni 2012, p. 2, Gezondheidsdienst voor Dieren, op issuu.com
4. Довідник ветеринарного лікаря птаховничого підприємства. Т.1-2. - СПб., 1995 р.
5. Джавадов Э.Д. Вірус-індуковані імуносупресії та способи їх попередження у промисловому птахівництві. // Автореферат дис. докт. вет. наук - М. - 2004. С.50.
6. Асоційована вакцина проти ньюкаслської хвороби, реовірусного теносиновита і метапневмовірусної інфекції птахів емульсійна інактивована / <http://findpatent.com.ua/patent/248/2480238.html>
7. Борисов В.В., Борисов О.В., Старов С.К. Особливості застосування інактивованих вакцин у птахівництві // БЮ. - 2007. - №2. - С.37-41.
8. Ассоциированная инактивированная вакцина против синдрома снижения яйценоскости-76, инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, реовирусного теносиновита и инфекционной бурсальной болезни птиц и её физико-биологические свойства / В.В. Борисов, Д.А. Лозовой, Д.Л. Долгов [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005. – Т. 3. – С. 292-302.

9. Бирман, Б.Я. Опыт ассоциированной иммунизации птиц против инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни / Б.Я. Бирман, В.П. Голубничий, Е.А. Лейкинд // Вет. наука – произ-ву. – Минск, 1992. – Вып. 30. – С.15-18.
10. Джавадов, Э.Д. Опыт применения поливалентной инактивированной вакцины «Авикрон» для молодняка домашней птицы / Э.Д. Джавадов, А.С. Дубовой, Ф.И. Полежаев // Матер. конф. по птицеводству. – Зеленоград, 2003. – С. 208-216.
11. Дубовой, А.С. Ассоциированные инактивированные вакцины для профилактики вирусных болезней птиц / А.С. Дубовой // Материалы науч.-произв. конф. посвящ. 190-летию высшего вет. обр. в России и 100-летию вет. науки: Ч. 1. – СПб, 1998. – С. 74-75.
12. Дубовой, А.С. Иммуитет у птицы, привитой поливалентной инактивированной эмульсинвакциной «Авикрон» / А.С. Дубовой, Э.Д. Джавадов, Ф.И. Полежаев // Ветеринария. – 2004. – №4. – С. 13-14.
13. Болотников, И. А. Гематология птиц [Текст] / И.А.Болотников, Ю.В.Соловьев// – Л.: «Наука», 1980. – 156 с.
14. Коровин, Р. Н. Лабораторная диагностика болезней птиц [Текст]: справочник / Р.Н. Коровин [и др.] – М.: Агропромиздат, 1989. – 256 с.
15. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Электр. ресурс] / Спосіб доступу: http://www.oie.int/leng/en_index.htm .– Заголовок з екрану.
16. Справочник специалиста ветеринарной лаборатории [Текст] / Н. В. Коротченко [и др.] / под ред. Ю. П. Смиряна. – К.: Урожай, 1998. – 368 с.
17. Диагностика вирусных болезней животных [Текст]: справочник / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина// – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.

CLINICAL TRIAL of 4-VALENT ASSOCIATED INACTIVATED VACCINE AGAINST NEWCASTLE DISEASE, INFECTIOUS BRONCHITIS, INFECTIOUS BURSAL DISEASE AND EGG DROP SYNDROME DEVELOPED BY NSC «IECVM»

Stegniy B. T., Koshelev V. V., Muzyka D. V., Stegnyy A. B., Rula O. M., Tkachenko S. V.

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

Bogach M. V., Bogach T. V., Pchelinska L. V., Stepanova N. O.

Odessa Research Station of National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Odessa, Ukraine

Kuzmich G. S.

State Research and Control Institute of Biotechnology and Microorganisms Strains, Kyiv, Ukraine

The passage presents data of clinical trial of the biological product «AviVac-IECVM-2 – associated inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome» developed by NSC «IECVM». It has been found that the vaccine is high-immunogenic and antigenically active product. It's using in preventive measures system will allow to significantly reduce poultry morbidity caused by Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome as well as reach epizootic welfare in poultry farms of Ukraine.

To conduct clinical trials of the biological product «AviVac-IECVM-2 – associated inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome» and determine antigenic activity and safety for poultry.

Materials and methods. Clinical trials of the biological product «AviVac-IECVM-2» has been conducted according to the follow indices: appearance, color, mold presence, impurities, vials of crack, signs of thaw, bacterial and fungi contamination; inactivation completeness (9–11-day SPF chicken embryos, 11-day buck embryos); harmlessness (90–120-day age chickens); antigenic activity (90–120-day age chickens); emulsion stability.

Antigenic features of vaccine components have been determined by poultry immunization in Odessa research station of NSC «IECVM» Poultry has been divided in 2 groups and marked with wing labels: experimental group дослідна (10 goals) and control group (5 goals). Immunization of 93-day Adler Silver breed chickens has been conducted with experimental samples of «AviVac-IECVM-2 - associated inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome» in the chest muscle at a dose of 0,5 cm³. Antibodies level in blood sera of experimental chickens has been determined before immunization, on 7th, 14th 21st and 28th day, and then every 30 days for 6 months with hemagglutination inhibition test for ND and EDS viruses; with ELISA test – for IBD and IBV viruses [13, 14, 15].

Conclusions. 1. As a result of trials infectious activity of ND («La-Sota»), IBV («H-52»), IBD («Kharkiv`12») and ADS viruses («Crimea`07») reached 11,36 EID₅₀/0,2 sm³; 8,23 EID₅₀/0,2 sm³; 8,37 EID₅₀/0,2 sm³ and 9,0 EID₅₀/0,2 sm³ respectively.

2. Immunization of 93-day chickens has been conducted with experimental samples 4-valent vaccine «AviVac-IECVM-2» (associated inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome).

3. «AviVac-IECVM-2 – associated inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome» biological product was developed and manufactured in National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» meets TCU in terms of quality and could be recommended for providing in veterinary practice in the current order.

Keywords: *vaccine, Newcastle disease, infectious bronchitis, infectious bursal disease, egg drop syndrome, blood sera, poultry*