

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 619:615.371. 616.921.5

**Ж. Кыдырбаев, Н.Н. Асанжанова, А.С. Нурпейсова, Е.К. Кулбеков,
Е.Т. Мырзахметов, Н.Ж. Акмырзаев, Ж.А. Турсынова**

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
пгт. Гвардейский, Казахстан
E-mail: kydyr2@mail.ru

ИСПЫТАНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ ВАКЦИНЫ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА RG43A (H5N8)

Аннотация. В работе представлены результаты определения безвредности и иммуногенности производственных серий вакцины инактивированной против гриппа птиц из нового рекомбинантного штамма A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A, далее сокращенно RG43A (H5N8), приготовленной по ранее разработанной технологии. Вакцина безвредна при внутримышечном введении пятикратной дозы в объеме 2,5 см³ для цыплят 88 сут. возраста. Вакцина иммуногенна при внутримышечном введении в дозе 0,5 см³, средние титры антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 на 28 сутки после введения препарата составили 1:224. Исследования позволили установить иммуногенные возможности вакцины из рекомбинантного штамма. Результаты опытов показали преимущество использования адаптированного к эмбрионам рекомбинантного штамма взамен полевого вируса гриппа птиц субтипа H5.

Ключевые слова: инактивированная вакцина, рекомбинантный штамм, стандарт организации, безвредность, иммуногенность.

Ж. Қыдырбаев, Н.Н. Асанжанова, А.С. Нурпейсова, Е.К. Кулбеков,
Е.Т. Мырзахметов, Н.Ж. Ақмырзаев, Ж.А.Тұрсынова

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,
Гвардейский қтп., Қазақстан

ҚҰС ТҰМАУЫНА ҚАРСЫ RG43A (H5N8) РЕКОМБИНАНТТЫ ШТАММЫНАН ЖАСАЛҒАН ИНАКТИВТЕЛГЕН ВАКЦИНАНЫҢ ӨНДІРІСТІК СЕРИЯЛАРЫНЫҢ ЗИЯНСЫЗДЫҒЫ МЕН ИММУНОГЕНДІЛІГІН ТЕКСЕРУ

Аннотация. Мақалада бұрын әзірленген технология бойынша дайындалған жаңа RG43A (H5N8) рекомбинантты штаммынан құс тұмауына қарсы инактивтелген вакцинаның өндірістік серияларының зиянсыздығы мен иммуногенділігін анықтау нәтижелері көрсетілген. Вакцина 88 тәулік балапандарға бес еселік дозаны 2,5 см³ көлемінде бұлшықет ішіне енгізгенде зиянсыз. Вакцина құстың бұлшықет ішіне 0,5 см³ дозада егілгенде иммуногенді. Вакцина егілгеннен кейін 28 тәулік өткенде құс тұмауы вирусының H5 субтипін қарсы антиденелердің орташа титрлері 1:224 құрады. Зерттеулер рекомбинантты штаммнан жасалған вакцинаның иммуногендік мүмкіндіктерін анықтады. Жұмыс нәтижелері вакцина жасау барысында құс тұмауының далалық вирусының орнына эмбриондарға бейімделген рекомбинантты штаммды қолданудың артықшылығын көрсетті.

Кілт сөздер: инактивтелген вакцина, рекомбинантты штамм, ұйым стандарты, қауіпсіздік, иммуногендік.

Zh. Kydyrbayev, N.N. Assanzhanova, A.S. Nurpeisova, E.K. Kulbekov,
E.T. Myrzakhmetov, N.Zh. Akmyrzaev, Zh.A. Tursynova

RGE «Research Institute for Biological Safety Problems»,
Gvardeiskiy, Kazakhstan

PRODUCTION SERIES OF INACTIVATED AVIAN INFLUENZA VACCINE MADE OF RECOMBINANT STRAIN RG43A (H5N8) SAFETY AND IMMUNOGENICITY TESTING

Abstract. The paper presents the results of determining the safety and immunogenicity of the production series of the avian influenza inactivated vaccine made of the new recombinant strain A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5N8)-PR8-IDCDC-RG43A, hereinafter abbreviated RG43A (H5N8), prepared according to previously developed technology. The vaccine is safe with intramuscular administration of a five-fold dose of 2,5 cm³ for chickens of 88 days age. The vaccine is immunogenic when administered intramuscularly at a dose of 0,5 cm³, the average titers of antibodies to the avian influenza virus subtype H5 on the 28th day after administration of the drug were 1:224. Studies have established the immunogenic capabilities of the vaccine from the recombinant strain. The results of the experiments showed the advantage of using a recombinant strain adapted to embryos instead of the field avian influenza virus subtype H5.

Key words: inactivated vaccine, recombinant strain, proprietary standard, safety, immunogenicity.

Введение. Высокопатогенный грипп птиц A/H5N1 в 1999–2006 годы был широко распространен среди диких и домашних птиц на территории стран Юго-Восточной Азии, затем в Западной Сибири (в том числе и в Казахстане), Европе, Восточной Африке и вызывал многочисленные вспышки, которые сопровождались заболеванием и гибелью домашних, диких птиц, а также людей [1].

В Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности КН МОН РК (НИИПББ) были изучены биологические свойства выделенных вирусов и по результатам исследований разработана технология изготовления инактивированной вакцины против гриппа птиц из аутогенного штамма A/domestic goose/Pavlodar/1/05 (H5N1), клайд 2.2. Разработанная вакцина после производственного испытания в хозяйствах Северо-Казахстанской, Восточно-Казахстанской и Жамбылской областей была зарегистрирована в министерстве сельского хозяйства Республики Казахстан. С 2008 по 2021 год в НИИПББ было приготовлено свыше 80 млн доз вакцины для специфической профилактики гриппа птиц в хозяйствах республики.

Однако в последнее время характер эпизоотических вспышек и течения гриппа птиц изменились. По данным ВОЗ в период с 2013 по 2018 год сообщалось о циркуляции в очагах вспышек болезни в Европе субтипов H5N1, H5N2, H5N5, H5N6, H5N8, H5N9, H7N7, в Азии – H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H5N8, H7N9, в Северной Америке – H5N1, H5N2, H5N8, H7N3, H7N8, H7N9, в Африке – H5N1, H5N2, H5N8, в Океании – H7N2 [2]. В мире и сопредельных Казахстану государствах, зарегистрированы вспышки вируса гриппа птиц субтипа H5 в различных вариациях H5N8, H5N6, H5N2, клайд 2.3.2.1 и 2.3.4.4 [3]. Согласно официальным данным министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, вспышки птичьего гриппа H5N8 зарегистрированы осенью 2020 года в хозяйствах Акмолинской, Жамбылской, Карагандинской, Костанайской, Павлодарской, Северо-Казахстанской, Туркестанской областей. В целом порядка 20000 голов птицы погибло в личных подсобных хозяйствах и более 200000 голов – на птицефабриках [4].

Анализ литературы показал, что нынешний штаммовый состав (A/H5N1, клайд 2.2) разработанной нами вакцины против гриппа птиц становится менее актуальным. Использование вакцин с низкой степенью гомологии по отношению к циркулирующему вирусу может привести к клиническому заболеванию и усилить экскреции вируса во внешнюю среду у вакцинированного поголовья при заражении [5].

Следует отметить, что большинство развитых стран мира в настоящее время начали готовить вакцины из рекомбинантных штаммов, приготовленных в сервисных лабораториях ВОЗ методами обратной генетики с заданными параметрами культуральных свойств.

В настоящее время назрела необходимость создания в условиях Казахстана более совершенных инактивированных вакцин из рекомбинантных штаммов, которые по клайдовому составу соответствуют или близки к диким штаммам вируса гриппа птиц, циркулирующих в республике.

В этой связи НИИПББ получил ряд рекомбинантных штаммов из референс лабораторий ВОЗ для актуализации штаммового состава производственных серий вакцины против высокопатогенного гриппа птиц. В институте проведены серии исследований по оптимизации культуральных свойств и определения иммуногенности полученных рекомбинантных штаммов, в том числе рекомбинантного штамма RG43A (H5N8). Впоследствии была разработана и приготовлена из этого штамма опытно-производственная серия инактивированной вакцины против гриппа птиц субтипа H5.

Технологические аспекты разработки опытно-промышленной серии вакцины показаны в опубликованных работах [6,7]. В дальнейшем были приготовлены производственные серии вакцины против гриппа птиц субтипа H5 из указанного штамма.

Цель исследования – определение безвредности и иммуногенности производственных серий инактивированной вакцины против гриппа птиц из нового рекомбинантного штамма RG43A (H5N8).

Материалы и методы:

- вакцина инактивированная эмульгированная против гриппа птиц из рекомбинантного штамма RG43A(H5N8) – производственная серия №34, изготовленная 15.12.2020 г., производственная серия №35, изготовленная 18.12. 2020 г., производственная серия №36, изготовленная 20.12. 2020 г. Производственные серии вакцины приготовлены согласно Инструкции по изготовлению и контролю вакцины, утвержденной в 2017 году;

- цыплята 88 сут возраста из хозяйств, благополучных по острым инфекционным болезням и серонегативные к вирусу гриппа типа А;

- сыворотки крови птиц опытной группы и не привитой (контрольной) группы;

- антиген вируса гриппа птиц рекомбинантного штамма RG43A(H5N8), вирус инактивирован димером этиленмина.

Определение безвредности вакцины

Каждую серию вакцины в объеме 2,5 см³ вводили 5 цыплятам в грудную мышцу и наблюдали на протяжении 10 суток.

Определение иммуногенности вакцины

Каждую серию вакцины в объеме 0,5 см³ вводили 10 цыплятам в грудную мышцу. За привитыми цыплятами вели клиническое наблюдение на протяжении 28 сут. На 28 сутки отбирали образцы крови согласно СОП-СМК-НИИПББ-НР-379-2020 и исследовали в реакции торможения гемагглютинации по общепринятой методике (СОП-СМК-НИИПББ-НР-509-2020).

Результаты исследования

Определение безвредности вакцины

Для определения безвредности вакцину каждой серии по 2,5 см³ (5 раз превышает прививную дозу) вводили 5 цыплятам 88 сут возраста в грудную мышцу. За привитыми цыплятами вели клиническое наблюдение на протяжении 10 сут. За время клинического наблюдения на протяжении 10 сут. цыплята были клинически здоровы, какие-либо отклонения от физиологической нормы не наблюдались, все привитые птицы остались живыми.

Вакцина инактивированная эмульгированная против гриппа птиц из рекомбинантного штамма RG43A (H5N8) (серия 34, серия 35, серия 36) безвредна для птиц.

Определенный интерес представлял определение уровня накопления антител у привитых птиц этой группы пятикратной дозой вакцины. Исследования были направлены для изучения возможностей увеличения титра антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 при увеличении иммунизирующей дозы препарата. У привитых птиц пятикратной дозой вакцины (2,5 см³) на 28 сутки после иммунизации отбирали кровь и определяли уровень накопления антител в сыворотках крови птиц. Результаты исследований представлены в рисунке 1.

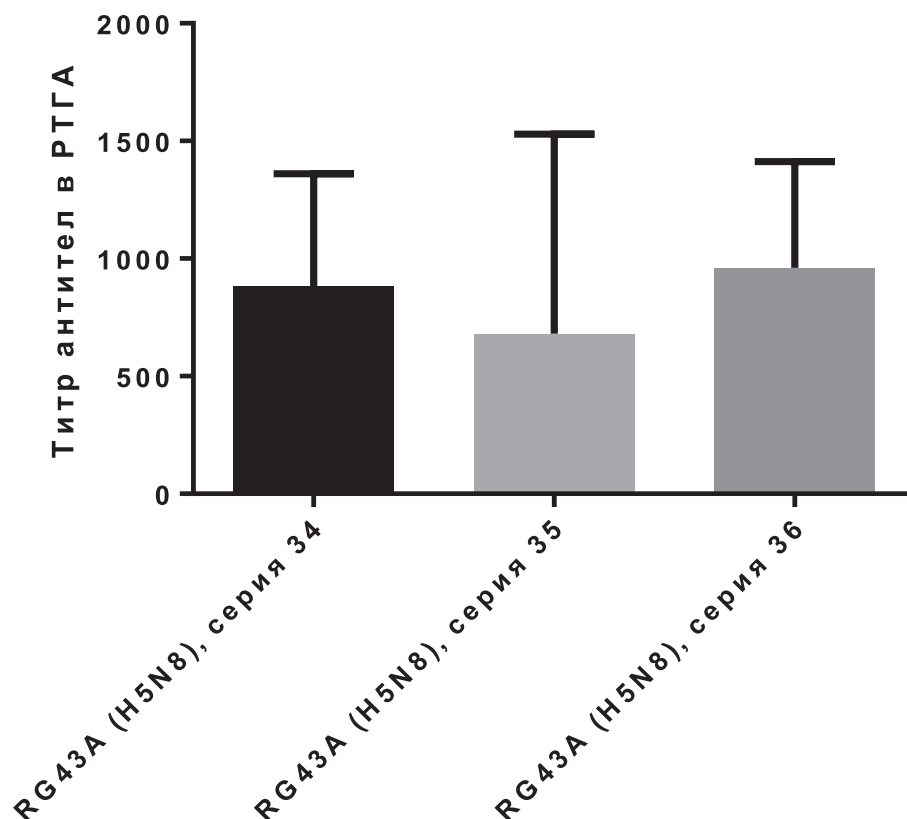


Рисунок 1 – Средние титры антител к вирусу гриппа субтипа H5 у птиц, привитых пятикратной дозой

Средние титры антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 у привитых серией вакцины 34 составили – 1:880, вакциной серии 35 – 1:680, вакциной серии 36 – 1: 960. Исследования показали, что вакцинация в пятикратной дозе не оказывает на птицу негативного воздействия. Отмечался существенный прирост титра антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5, что следует учесть при реальной угрозе вспышки болезни.

Определение иммуногенности вакцины

Определение иммуногенности вакцины проводили по стандарту организации СТ 405-1919-04 ГП-096-2017.

Цыплят вакцинировали производственными сериями вакцины №34, №35 и №36, вакцину ввели в грудную мышцу в дозе 0,5 см³. За время наблюдения на протяжении 28 сут. птицы были клинически здоровыми. Результаты определения уровня накопления антител в сыворотках крови цыплят к вирусу гриппа птиц субтипа H5 в РТГА на 28 сутки после вакцинации показаны в рисунке 2.

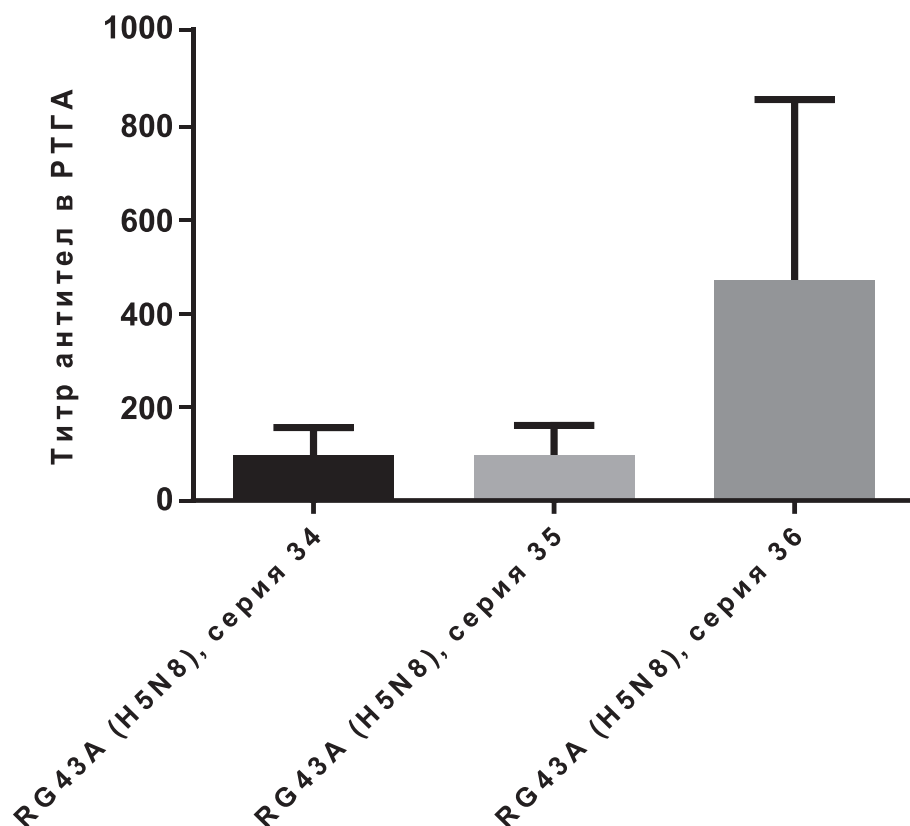


Рисунок 2 – Уровень накопления антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 на 28 сутки после вакцинации

Данные рисунка 2 свидетельствуют, что вакцина серии 34 иммуногенна для цыплят, средний титр антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 составил 1:90.

Аналогичные результаты накопления антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 получены у птиц, привитых вакциной серии №35. Средний титр антител составил 1:90.

Вакцина серии 36 отличается более высокой иммуногенностью для цыплят, средний титр антител составил 1:492, что в 5 раз превышает аналогичные показатели вакцины серии №34 и серии №35, что, возможно, связано с кондиционными особенностями этой группы цыплят.

Обсуждение полученных данных. Наши исследования опережали появление высокопатогенного гриппа птиц субтипа H5N8 на территории Казахстана. Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности в 2018 году получил из референс-лаборатории ВОЗ (CDC, США) рекомбинантный штамм RG43A (H5N8) для разработки и приготовления производственных серий вакцины. Антигенный состав по гемагглютинину и нейраминидазе (H5N8) рекомбинантного штамма полностью соответствовал циркулирующему тогда в приграничных регионах России дикому вирусу гриппа птиц. И использованный рекомбинантный штамм получен методом обратной генетики с требуемыми антигенными характеристиками со сниженной вирулентностью и повышенной репликативной активностью в эмбрионах. Нами актуализирован штаммовый состав коммерческой инактивированной вакцины против гриппа птиц субтипа H5. Антигенное соответствие между вакцинным и полевым вирусами является одним из основных факторов эффективности гриппозных вакцин.

Приготовленные нами по ранее разработанной технологии производственные серии вакцины из рекомбинантного штамма RG43A (H5N8) безвредны для цыплят, уровень накопления титра антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 на 28 суток после однократной вакцинации приблизительно равен аналогичным показателям ранее разработанной нами инактивированной вакцины из эпизоотического штамма A/domestic goose/Pavlodar/1/05 (H5N1) [8].

Заключение

1 Производственные серии №34, №35, №36 вакцины инактивированной эмульгированной против гриппа птиц из рекомбинантного штамма RG43A (H5N8), изготовленные в НИИПББ 15, 18, 20 декабря 2020 года соответственно, безвредны для цыплят 88 сут возраста. Введение вакцины в дозе 2,5 см³ внутримышечно не вызывает какие-либо отклонения от физиологической нормы на протяжении 10 сут. клинического наблюдения.

2 Производственные серии № 34, № 35, № 36 вакцины инактивированной эмульгированной против гриппа птиц из рекомбинантного штамма RG43A (H5N8) иммуногенны для цыплят 88 сут возраста при введении внутримышечно в дозе 0,5 см³. Производственные серии №34, №35, №36 на 28 суток после вакцинации обусловили формирование антител к вирусу гриппа птиц субтипа H5 в среднем титре 1:90, 1:90, 1:492 соответственно.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта программно-целевого финансирования 0.0878 «Ветеринарная безопасность территории Республики Казахстан: эпизоотологический мониторинг, испытание, внедрение и коммерциализация средств специфической профилактики и диагностики особо опасных инфекционных заболеваний» (ИРН BR06249226) при финансировании Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, договор №28 от 10 сентября 2018 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кыдырбаев Ж.К., Табынов К.К., Хайруллин Б.М. Высокопатогенный грипп птиц: Распространение в Казахстане и разработка средств специфической профилактики // «Асыл кітап». – Алматы, 2015. – 356 с.
2. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness // World Health Organization, 28 September, 2017. – 2017.
3. <https://kazakh-zerno.net/127932-v-mire-nablyudaetsya-tendentsiya-k-rostu-vspyshek-grippa-u-domashnikh-ptits/>
4. <https://inbusiness.kz/ru/last/ptichij-gripp-v-kazahstane-cto-nado-znat-o-zabolevanii>
5. Swayne D.E., Kapczynski D. Vaccines, vaccination and immunology for avian influenza viruses in poultry. In: Swayne D.E., ed. Avian Influenza. Ames, Iowa: Blackwell Publishers; – 2008: 407-52.
6. Нурпейсова А.С., Кыдырбаев Ж., Касенов М.М., Асанжанова Н.Н., Инкарбеков Д.А., Хайруллин Б.М., Закарья К.Д. Приготовление опытно-промышленных серий вакцин из актуальных штаммов гриппа птиц // Тезисы доклада на VI Международной конференции молодых ученых биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Сборник тезисов АНО «Инновационный Центр Кольцово». – Новосибирск ИПЦ НГУ, 2019. – № 3. – С 374.
7. Mailybayeva A., Nurpeisova A.S., Assanzhanova N.N., Kozhamkulov Y.M., Inkarebekov D.A., Abitayev R.T., Jekebekov K.K., Nurabayev S.Sh., Kassenov M.M., Khairullin B.M., Kydyrbayev Zh., Valdovska A., Zakarya K.D. Optimization of cultivation condition of subtype H5 flu virus // «Вестник НАН РК». – 2020. – № 6. – С 71.
8. Kydyrbayev Z., Tabynov K., Ryskeldynova S., Mamadaliyev S., Khairullin B. Immunogenicity of the inactivated oil emulsion influenza A(H5N1) vaccine in chickens. Agriculture and Biologi Journal of North America. – 2010, – P. 201-207.