

УДК 619:616.98:578.831.1

РАЗРАБОТКА СУХОЙ ВИРУС-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Хрипунов Е.М., главный научный сотрудник, д-р вет. наук, профессор

Сухолейстер К.В., научный сотрудник

Белун О.В., старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Изотова Н.А., старший научный сотрудник, канд. вет. наук

Кушнир А.Т., заведующий лабораторией, д-р вет. наук

Колбасов Д.В., директор, д-р вет. наук, профессор

Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ), г. Покров

Аннотация: Была разработана вирус-вакцина против ньюкаслской болезни птиц на основе перловой крупы в качестве способа доставки вакцинного вируса в организм птицы. Вакцина, хранившаяся в течение 8 мес. при температуре от 4 до 6°C, смешанная в дозе 0,79 млрд ЭИД₅₀ и выше с дневной нормой корма, проявила в эксперименте 100%-ный уровень защиты кур, ранее зараженных эпизоотическим вирусом НБ.

Summary: A viral vaccine against Newcastle poultry disease using pearl barley as the means of vaccine virus delivery into chicken's organism was developed. The vaccine, that had been stored for 8 months at the temperature since 4 to 6°C at the dose of 0.79 mlrd EID₅₀ and higher and mixed with a daily ration of fodder, showed 100 per cent protection of chickens after their challenge with an epizootic ND virus strain.

Ключевые слова: ньюкаслская болезнь (НБ) птиц, перловая крупа, оральное применение, оральная иммунизация, защитная доза, куры.

Key Words: Newcastle poultry disease, pearl barley, oral administration, oral immunization, protective dose, chickens.

Ньюкаслская болезнь (НБ) — высококонтагиозное манифестное заболевание птиц, которое распространено во всем мире. Болезнь проявляется в виде септицемических, респираторных и желудочно-кишечных симптомов, а также отмечаются нарушения функции центральной нервной системы и снижение яйценоскости. Болеет птица многих видов, но наиболее часто поражается домашняя, в основном куры и, в меньшей степени, индейки и фазаны. Водоплавающая птица и голуби не заболевают или болеют легко, но могут быть носителями вируса. Инфицированная птица выделяет вирус с секретами и экскретами дыхательных и пищеварительных путей. У кур гибель может достигать 100% [1].

Источником инфекции являются куры, которые не могут полностью освободиться от возбудителя, постоянно циркулирующего в мелких хозяйствах. Они становятся резервуарами инфекции и представляют постоянную угрозу для промышленных ферм.

Вакцинация является одним из важнейших средств защиты от НБ.

Обычно используют живые вакцины из аттенуированных штаммов и инактивированные эмульгированные вакцины. Активный иммунитет, приобретаемый после вакцинации, обеспечивает относительно хорошую защиту, но его длительность и напряженность меньше, чем после естественного переболевания.

Известно, что в развитии иммунитета основное значение имеет лимфоидная система, которая особенно богата представлена лимфатическими образованиями на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, что дает возможность быстрого включения в иммунный ответ большого количества лимфоидной ткани и органов.

Существует несколько методов применения вакцинных препаратов: введение в организм кур внутримышечно, интраокулярно, интраназально, аэрозольно, выпаивание с питьевой водой, а также скармливание гранул, содержащих вакцинный живой вирус. Внутримышечный, интраокулярный и интраназальный являются индивидуальными способами

иммунизации, а выпаивание с питьевой водой, скармливание гранул и аэрозольный метод — групповыми.

Индивидуальные способы иммунизации целесообразны при обработке небольшого поголовья птиц. Значительные трудности возникают при проведении профилактических мероприятий на промышленных комплексах. Наиболее распространенным способом иммунизации птицы в промышленных хозяйствах является выпаивание вакцины с питьевой водой. Однако у этого технологичного в применении метода есть определенные недостатки: нестабильное качество питьевой воды и необходимость соблюдения определенного температурного режима при выпаивании вакцины. Указанные проблемы затрудняют получение желаемого результата. На наш взгляд, более эффективное решение задачи можно получить при иммунизации кур сухой вакциной, добавляемой в корм.

Вакцины для орального применения должны быть высокоиммуногенными, безвредными, ареактогенными и



не содержащими патогенной микрофлоры. Их следует готовить в форме, обеспечивающей легкость приема и наличие вещества, защищающего антиген от инактивации в желудке при длительном нахождении в кормушке в условиях «открытого воздуха» в широком диапазоне температур. Масса вакцины, содержащей иммунизирующую дозу, не должна превышать суточную норму корма.

Известно, что для оральной иммунизации кур против НБ птиц разработана гранулированная вакцина [2]. Технология получения включает формирование из порошка лактозы в псевдооживленном слое гранул размером 2–3 мм и последующее напыление на них стабилизированной экстраэмбриональной жидкости, содержащей вакцинный штамм «Ла-Сота» вируса НБ. Вакцина с активностью $9,25 \text{ Ig ЭИД}_{50/\text{г}}$ в массовой дозе 0,25 и 0,50 г/гол. (доза $4,5 \cdot 10^9$ и $9 \cdot 10^9$ ЭИД) обеспечивала формирование защиты при среднем титре антител соответственно 6,0 и 6,5 \log_2 . Гибель невакцинированных цыплят после контрольного заражения составила 100%.

Однако метод получения гранулированной вакцины — многостадийный и малопродуктивный.

Известен способ приготовления вакцины против НБ с использованием порошка лактозы и добавлением к нему вакцинного вируса V_4 в жидком виде. При скармливании от 7,0 до 10,0 г такой вакцины с сухим кормом достигается удовлетворительная защита цыплят от контрольного заражения [3].

В качестве средства доставки в организм вакцинного вируса НБ штаммов V_4 , V_{J_2} и «Ла-Сота» использовали неочищенный белый рис [4], а также необработанные и обработанные теплом ячмень и сорго [5]. В сравнительных опытах при интраокулярном введении и выпойке с питьевой водой показана перспективность применения очищенного и обработанного теплом зерна в качестве средства доставки вакцинного вируса в организм цыплят.

Анализ приведенных литературных данных свидетельствует о том, что, во-первых, зерно злаковых можно использовать как средство доставки вакцинного вируса в организм

птицы и, во-вторых, смесь вакцинного вируса с необработанным теплом зерном не позволяет получить защиту цыплят от контрольного заражения, что подтверждается отрицательной сероконверсией.

Целью наших исследований стала разработка способа получения сухой вирус-вакцины против НБ для оральной иммунизации птиц, обладающей высокой иммуногенностью, эффективностью и длительным сроком хранения.

В качестве сырья использовали вируссодержащую экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) растущих куриных эмбрионов (РКЭ), которых заражали вирусом НБ штамма «Ла-Сота» с активностью $10,50 \pm 0,3 \text{ Ig ЭИД}_{50/\text{см}^3}$. Активность вируссодержащей ЭЭЖ и сухой вакцины после приготовления и хранения проверяли титрованием на РКЭ, которых заражали через аллантоисную полость и инкубировали 92 ч при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 60–70%. Индикацию вируса осуществляли в реакции геммагглютинации (ГА) с эритроцитами петуха.

В качестве средства доставки вакцинного вируса в желудочно-кишечный тракт цыплят использовали крупу перловки, предварительно обработанную теплом (кипячением) и отмытую последовательно водопроводной и дистиллированной водой.

На дистиллированной воде готовили стабилизаторы: № 1 — смесь 40%-ного пептона и 8%-ной лактозы в соотношении 1:3 и № 2 — 4%-ный раствор гидролизата лактальбумина. Стабилизаторы стерилизовали авто-

клавированием при 1,2–1,5 ати в течение 1 ч.

Крупу пропитывали стабилизатором, добавляли вируссодержащую ЭЭЖ. Смесь наносили на поддон равномерным слоем высотой 3,0–5,0 мм. После предварительного замораживания при $-50 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 8–10 ч зерно лиофилизировали в сублимационной установке в течение 30–32 ч. После лиофилизации препараты помещали в стеклянные флаконы, герметично закупоривали резиновыми пробками и хранили при температуре 4–6°C в течение 13 мес.

Стерильность препаратов в отношении бактериальной и грибной микрофлоры проверяли высевом супернатанта вакцины на питательные среды.

Безвредность вакцины проверяли путем внутримышечного введения и скармливания 5-кратной иммунизирующей дозы. Для иммунизации вакцину смешивали с дневной дозой комбикорма и скармливали цыплятам в возрасте 18–30 суток. Уровень накопления антигемагглютинирующих антител и устойчивость цыплят к контрольному заражению определяли спустя 21 день после вакцинации.

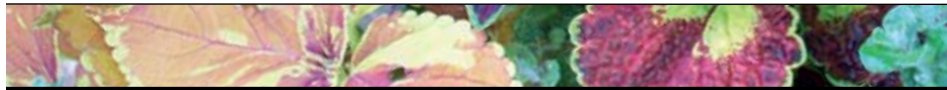
Для контрольного заражения использовали вирулентный штамм «Т-53» вируса НБ, который вводили внутримышечно в дозе 1000 ЛД₅₀.

Уровень биологической активности сухой вирус-вакцины и динамика ее изменения в процессе хранения приведены в *таблице 1*, из которой следует, что использование крупы перловки, обработанной теплом, дало положительные результаты, т.е. после лиофилизации активность

Таблица 1

Динамика биологической активности сухой вирус-вакцины против НБ в процессе хранения

Активность исходной ЭЭЖ (Ig ЭИД _{50/см³})	Срок хранения (мес.)	Биологическая активность вирус-вакцины Ig _{50/г}	
		образец № 1*	образец № 2**
10,5±0,3	0	10,0±0,2	10,5±0,3
	1,5	10,0±0,3	10,25±0,4
	2	9,5±0,1	9,75±0,1
	3	9,5±0,4	9,75±0,2
	6,0	9,5±0,2	8,25±0,3
	7,0	9,5±0,3	8,0±0,1
	8,0	9,5±0,1	8,0±0,3
	13	8,5±0,2	7,0±0,1



вируса НБ практически осталась на исходном уровне. Можно предположить, что использование необработанного зерна в составе оральных вакцин не дает положительных результатов из-за содержания в нем лектинов, оказывающих инактивирующее действие на вирус [6].

Образец вакцины № 1 с использованием крупы перловки, пропитанной смесью пептона и лактозы, в процессе хранения оказался более стабильным, по сравнению с образцом № 2, где применялась перловка, пропитанная гидролизатом лактальбумина. Следует отметить, что без снижения активности образец № 1 сохранялся в течение 8 мес. (табл. 1), а образец № 2 — в течение 3-х мес.

Таким образом, смесь пептона и лактозы оказала более выраженный стабилизирующий эффект в процессе хранения вакцины по сравнению с гидролизатом лактальбумина.

Для определения защитных свойств вирус-вакцины при оральном применении 18–30-суточным цыплятам скармливали комбикорм с добавлением в него вирус-вакцины из расчета 0,25 и 0,50 г на голову. Через 21 день после иммунизации цыплят заражали эпизоотическим вирусом НБ, штамм «Т-53», внутримышечно. Результаты оценивали по уровню антител в сыворотке крови до контрольного заражения и выживаемости после него. В качестве контроля использовали непривитых цыплят.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из данных таблицы следует, что через 6 мес. в после приготовления (образец № 1) и двухмесячного хранения (образец № 2) вакцина показала 100%-ный защитный эффект в дозах от 0,79 млрд ЭИД₅₀ и выше. Следовательно, использование обработанной теплом (кипячением) перловой крупы в качестве средства доставки вакцинного вируса в желудочно-кишечный тракт птицы позволяет получать вакцинный препарат для оральной иммунизации кур против НБ [7].

Испытанные вакцинные препараты обладают выраженной антигенностью и стимулируют выработку защитных антител в титрах от 1:16 и

Таблица 2

Иммуногенные свойства вирус-вакцины против НБ птиц для орального применения

Образцы, время хранения	Биологическая активность вирус-вакцины (Ig ЭИД _{50/г})	Кол-во вводимой вирус-вакцины, г	Доза вирус-вакцины, млрд ЭИД ₅₀	Кол-во цыплят в опыте, гол.	Титры антител у цыплят до вакцинации			Титры антител привитых цыплят через 21 день после вакцинации	Результат контрольного заражения (пало/заражено)	% защиты	
					титр						
					11 дней	18 дней	30 дней				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
№ 1* (6 мес. хранения)	9,5	0,25	0,79	10	1:2			1:16	1:32	0/10	100
					6			1	1		
					1:4			1:64			
		0,5	1,58	10	1:2		0/20	1:128	1:256		
					6			3	2		
					1:2			1:32	1:64		
					6			4	3		
					1:4			1:128	1:256		
					4			2	1		
Контроль (невакцинированные)				10			0/10			10/10	0
№ 2 (2 мес. хранения)	9,75	0,25	1,4	14	1:2**			1:16	1:32	0/14	100
					6			1	2		
					1:4			1:64			
		0,5	2,8	14	1:8			1:128	1:256		
					2			4	2		
					1:8			1:32	1:64		
					2			6	4		
					0			1:128	1:256		
					4			3	1		
Контроль (невакцинированные)				9		0/8				9/9	0
					1:2						
					1						

Примечание: * — Для эксперимента использовали вакцину со сроком хранения 6 мес., так как по инструкции ревакцинация предусмотрена через каждые 6 мес.

** — В группе цыплят для испытания образца вакцины № 2 кровь взята у 50% птиц, и значения титров в графе 11 имеют отношение к обеим испытанным дозам



выше у всех привитых цыплят. При Ньюкаслской болезни защитными являются титры от 1:8–1:10 и выше, обеспечивающие иммунитет у 80–100% привитых птиц. Для практического применения рекомендуются вакцины с биологической активностью не ниже $9,5 \text{ Ig ЭИД}_{50/\text{см}^3}$. В данном эксперименте предлагаемый образец вакцины № 1 оказался более устойчивым при длительном хранении при температуре 4–6°C и сохранил биологическую активность на требуемом уровне в течение 8 мес., а иммуногенность — в течение 6 мес. (срок наблюдения). □

Список литературы

1. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. — М.: Библионика, 2007. — С. 387–392.
2. Окрошидзе М.Г. Разработка новой технологии изготовления вирус-вакцины орального назначения против Ньюкаслской болезни птиц // Биотехнология. — 2002. — № 6. — С. 46–51.
3. Rehmani S.F., Spradbrown P.B. West R. Lactose pellets a new approach to oral Vaccination of Village chickens against Newcastle disease // Vet. Microbiol. — 1995. — Sep. 46 (1–3). — P. 47–53.
4. Samuel J.L., Bensik Z., Spradbrow P.B. Oral Vaccination of chickens with the V 4 strain of Newcastle disease virus. Cooked and raw white rice as a vehicle // Trop. Anim. Health. Prod. — 1993. — Feb. 25 (1). — P. 2–10.
5. Nasser M., Lohr J.E., Mebratu Y.V., Zessin K.-H., Baumann M.P.O., Ademe Z. Oral Newcastle disease Vaccination trials in Ethiopia // Avian Pathology. — 2000. — № 29. — P. 27–34.
6. Rehmani S.F., Spradbrow P.B. The contribution of lectins to the interaction between oral Newcastle disease Vaccine and grains // Vet. Microbiol. — 1995. — Sep. 46 (1–3). — P. 55–62.
7. Хрипунов Е.М., Сухoleyстер К.В., Белун О.В., Сливко И.А., Изотова Н.А., Кушнир А.Т., Власов Н.Н., Колбасов Д.В. Способ изготовления вирусвакцины против Ньюкаслской болезни птиц для орального применения. Патент № 2378013, опубл. 10.01.2010, бюлл. № 1.

Для контактов с авторами:
Хрипунов Егор Максимович
Сухoleyстер Кира Васильевна
Белун Ольга Владимировна
Изотова Надежда Александровна
Кушнир Анатолий Тимофеевич
Колбасов Денис Владимирович
 e-mail: vniivim@niiv.petush.elcom.ru

ВОПРОС — ОТВЕТ

В каком направлении ведутся поиски в области бесхлорной обработки тушек птицы в США?

ОЧИСТКА ТУШЕК БРОЙЛЕРОВ ОТ БОЛЕЗНЕТВОРНЫХ БАКТЕРИЙ **Broiler Carcass Cleansing Solution Removes Harmful Bacteria**

Предложено новое решение очистки потрошенной тушки курицы. Оно оказалось эффективным по отношению к болезнетворной бактерии, вызывающей пищевое отравление у людей. Исследование проводилось в рамках программы Сельскохозяйственной исследовательской службы США (*Agricultural Research Service — ARS*).

Полученные данные могут быть полезны производителям птицы, заинтересованным в очистке тушек птицы без использования хлора. Очиститель, состоящий из лауриновой кислоты и гидроксида калия, можно использовать на стадиях обработки тушек, предшествующих охлаждению. Поскольку во многих странах отказались от хлора при обработке тушек птицы, в США тоже присматриваются к альтернативным очистителям.

В рамках программы ARS микробиолог Артур Хинтон (*Arthur Hinton*) и физиологи Джон Кейсон (*John Cason*) и Ричард Б. Рассел (*Richard B. Russell*) провели в Университете г. Афины (штат Джорджия, США) серию работ с целью найти лучший способ использования смесей лауриновой кислоты и гидроксида калия для санитарной обработки тушек птицы.

В первой серии тушки опрыскивали смесями различной концентрации, и результаты показали, что при 2%-ной концентрации лауриновой кислоты и 1% калия удается удалить наибольшее число бактерий с поверхности тушки. Это свидетельствует о том, что концентрация — это важный фактор для очистителя, используемого для санитарной обработки.

В другой серии применяли опрыскивание под разным давлением (60, 100 и 150 фунтов/дюйм²) и обнаружили, что давление не имеет большого значения для эффекта снижения контаминации.

Еще исследователи проверили, имеет ли значение время обработки спреем. Тушки опрыскивали в течение 5, 15 и 30 с. Чем дольше обрабатывали, тем лучше были результаты.

«International Journal of Poultry Science». Июнь, 2010.