

УДК: 619:578.832.1:636.5

НАУКОВИЙ СУПРОВІД МОНІТОРИНГУ, ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ В УКРАЇНІ

Стегній Б. Т., Музыка Д. В., Стегній А. Б.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

***Резюме.** В статті представлена робота Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» щодо наукового супроводу проблеми високопатогенного грипу птиці в Україні. Наведені результати епізоотологічного моніторингу, розробки вітчизняних засобів специфічної діагностики та профілактики високопатогенного грипу.*

***Ключові слова:** високопатогенний грип, вакцина, діагностикум*

***Summary.** Work, conducted in the National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine" concerning scientific maintenance of the problem of highly pathogenic avian influenza is presented in the paper. Results of epizootological monitoring, development of domestically produced means for specific diagnostics and prophylaxis are given in the paper.*

***Key words:** vaccine, high pathogenic avian influenza*

За даними Міжнародного епізоотичного бюро в 2007 році високопатогенний грип птиці (H5N1) було зареєстровано в 42 країнах Європи, Азії, Африки. Вже в 2008 році високопатогенний грип птиці (H5N1) виявлено в 17 країнах світу. Крім того в деяких країнах були зареєстровані випадки захворювання птиці на високопатогенний та низькопатогенний грип підтипу H7. В Україні захворювання на високопатогенний грип було виявлено в середині січня 2008 року на приватній птахофабриці в с. Рівне Красногвардійського р-ну АР Крим [1, 2, 4, 5].

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» як провідна ветеринарна наукова установа активно долучилася до вирішення проблеми високо патогенного грипу птиці відразу після її виникнення. В 2005 року в ННЦ «ІЕКВМ» була створена Референс-лабораторія з грипу птиці, основними напрямками роботи, якої є постійний епізоотологічний моніторинг щодо грипу свійських та диких птахів; при виникненні осередків високопатогенного грипу на території України участь в ізоляції збудника, його ідентифікації, визначенні патогенності, а також виявлення джерел та шляхів попадання інфекції; розробка вітчизняних засобів специфічної профілактики та діагностики.

Співробітники інституту вже понад 7 років проводять епізоотологічний моніторинг щодо грипу птиці на інших небезпечних інфекційних захворювань серед диких птахів. Дослідження птиці проводяться в місцях їх масового скупчення під час міграції та гніздування на озері Сиваш, заповіднику «Асканія-Нова», Чорноморському заповіднику, в Одеській та Херсонській областях. Було досліджено понад 5 тисяч диких птахів, які відносяться до 70 видів. Результати цих досліджень свідчать про широку циркуляцію вірусів грипу різних підтипів в популяціях диких птахів, в тому числі і підтипу H5N1. В 2006 році у диких птахів виявляли антитіла до підтипів вірусу грипу: H1, H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, а в 2007 році - підтипів H3, H5, H6, H8, H9, H13, H14 та вірусу ньюкаслської хвороби. Особлива увага приділяється епізоотологічному моніторингу сільськогосподарських птахів присадибних господарств. Особливістю присадибного птахівництва є утримання птиці без дотримання належних ветеринарно-санітарних вимог, що може сприяти виникненню та поширенню високопатогенного грипу птиці. Це стосується «зон ризику», де висока ймовірність контактів свійських птахів присадибних господарств з дикими. При проведенні вірусологічних досліджень в 2007 році від диких та сільськогосподарських птахів отримано 14 гемаглютинуючих ізолятів. З них 6 віднесено до вірусу грипу А та 8 - до вірусу ньюкаслської хвороби.

Важливим напрямком роботи ННЦ «ІЕКВМ» є участь у протиепізоотичних заходах при спалахах грипу птиці на території України. Починаючи з перших випадків захворювання сільськогосподарської птиці на високопатогенний грип у 2005-2006 роках в АР Крим, співробітники нашого інституту приймають активну участь у постановці діагнозу, ізоляції збудника, його ідентифікації та вивченні біологічних та молекулярно-генетичних властивостей. За останні роки (2005-2008) від свійських птахів під час спалахів було ізольовано декілька епізоотичних штами вірусу високопатогенного грипу птиці H5N1: А/курка/Сиваш/02/05, А/курка/Приморський/02/06, А/курка/Красногвардійський/58/08, А/курка/Красногвардійський/59/08, А/курка/Красногвардійський/60/08. Зараз ретельно вивчаються їх біологічні та молекулярно-біологічні характеристики.

Одним з пріоритетних напрямків наукових досліджень науковців ННЦ «ІЕКВМ» є створення вітчизняних засобів специфічної діагностики та профілактики грипу птиці. Вже розроблена технологія виготовлення гомологічної інактивованої емульсованої вакцин проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ». На завершальній стадії знаходиться розробка гетерологічної вакцини з використанням штаму H5N3, асоційованої інактивованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби.

Вакцина «АвіФлуВак-ІЕКВМ» пройшла державні комісійні випробування на Херсонській державній біологічній фабриці та виробничі

випробування в одному з селищ Херсонської області. Контроль якості вакцини проводився згідно суворим вимогам МЕБ та Державного науково-контрольного інституту штамів мікроорганізмів [3]. За всіма показниками: зовнішній вигляд, колір, в'язкість, відсутність сторонніх домішок, стабільність емульсії, залишкова кількість інактивантів - вакцина відповідала міжнародним стандартам. Особлива увага була приділена повноті інактивації вірусу, нешкідливості вакцини, антигенним та імуногенним властивостям. За результатами випробувань було встановлено, що вірус повністю інактивований та не викликає загибель курячих ембріонів протягом 3 послідовних «сліпих» пасажів. При введенні птиці двократної дози не спостерігалось жодних клінічних проявів захворювання та місцевої реакції в місці введення біопрепарату. При визначенні антигенних властивостей встановлено, що щеплення птиці викликає формування стійкого напруженого імунітету. Вже через 21 добу після одноразового щеплення титр антитіл у курей до вірусу становив $6,30 \pm 0,42 - 6,80 \pm 1,88 \log_2$ в реакції затримки гемаглютинації, а після ревакцинації з інтервалом 3 тижні середній титр антитіл досягав 9,25-11,40 \log_2 . Рівень антитіл у качок, гусей та індиків після ревакцинації становив відповідно $6,6 \pm 2,06$; $6,4 \pm 0,89$ та $7,5 \pm 0,57 \log_2$.

Імуногенна активність вакцини «АвіФлуВак-ІЕКВМ» була перевірена під час лабораторних та виробничих випробувань шляхом прямого інфікування високопатогенним контрольним вірусом, які проводились з використанням спеціальних боксів 3-го класу захисту. Для досліду було сформовано дві групи курчат: дослідна (вакциновані курчата) та контрольна (не вакциновані). Через 4 тижні після ревакцинації курчата дослідної групи та не вакциновані з контрольної групи були заражені вірулентним вірусом. Щоденно протягом 7 діб від дослідних та контрольних курчат відбиралися клоакальні змиви для визначення вірусовиділення. За курчатами було встановлено спостереження. Через 36-40 годин усі контрольні (не вакциновані) курчата загинули з клінічними проявами захворювання. З клоакальних змивів цієї птиці було реізолювано збудника. В той же час усі вакциновані курчата протягом 14 діб (період спостереження) залишалися клінічно здоровими та протягом 7 діб у них не було виявлено виділення вірусу до навколишнього середовища.

За результатами випробувань інактивована емульсована вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» була визнана безпечною, нешкідливою для птиці та рекомендована для використання в практиці ветеринарної медицини. На вакцину «АвіФлуВак-ІЕКВМ» розроблена нормативна документація ТУ У 24.4-00497087-041:2006, інструкція з виготовлення та контролю. Вакцина зареєстрована в Україні (реєстраційне посвідчення № 2297-04-0267-06 від 26.12.2006).

Лабораторні дослідження по вивченню антигенної активності асоційованої вакцини проти високо патогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби показали хороші антигенні властивості цього біопрепарату. Так, через 60

діб після вакцинації рівень антитіл до вірусу грипу H5 в сироватці крові індиків становив 6,0 – 7,5 log₂, а до вірусу ньюкаслської хвороби – 5,0 – 7,0 log₂. На інактивовану асоційовану емульсовану вакцину проти пташиного грипу та ньюкаслської хвороби отримано деклараційний патент України № 25751 від 27.08.2007 року.

Важливим аспектом контролю грипу птиці є діагностика захворювання. Тому нами були розроблені тест-системи для діагностики грипу А у птиці з використанням традиційних методів таких як РЗГА та новітніх – ПЛР.

Для виявлення антитіл до вірусу H5 в сироватці крові свійської та дикої птиці була розроблена тест-система «АвіФлуТест H5N1», в якій використано вітчизняний актуальний епізоотичний штам. Тест-система пройшла апробацію на значній кількості польових та стандартних проб сироваток від свійських та диких птахів різних видів, у т.ч. в порівняльному аспекті, при використанні референтних антигенів. Результати апробації довели, що тест-система «АвіФлуТест H5N1» має високу чутливість та специфічність. Тест-система «АвіФлуТест H5N1» (ТУ У 24.4-00497087-052:2006, реєстраційне посвідчення № 2743-14-0301-07) використовується для виявлення антитіл до вірусу грипу H5N1 в сироватках крові та жовтках яєць диких птахів, а також для визначення напруженості імунітету у сільськогосподарської птиці після застосування інактивованих вакцин проти високопатогенного грипу птиці.

Комісійні випробування проходить тест-система для виявлення антитіл до 14 підтипів вірусу грипу А в сироватках крові сільськогосподарської та дикої птиці (ТУ У 24.4-00497087-052:2008).

Розроблено праймерні системи та методики їх застосування для індикації вірусу високопатогенного грипу птиці, розраховані праймери AivH5-F і AivH5-R, які мають високі показники ПЛР-quality та фланкують високоваріабельну ділянку гену гемаглютиніну довжиною 487 п.н. На основі цих праймерів було розроблено «Тест-систему для виявлення РНК високопатогенного вірусу грипу птиці» (ТУ У 24.4-00497087-060:2007), яка має високу специфічність та чутливість. Запропоновано методику їх використання для діагностики грипу та ідентифікації ізолятів H5N1-субтипу, яка затверджена НТР Державного департаменту ветеринарної медицини України (протокол №3 від 23.12.2006 р.).

Обидві ПЛР-методики пройшли апробацію на більш ніж 200 польових зразках від дикої та синантропної птиці.

Висновки.

1. Основними напрямки роботи Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», як провідної наукової установи ветеринарної медицини України є постійний епізоотологічний моніторинг щодо грипу свійських та диких птахів, участь в ізоляції збудника, його ідентифікації та визначенні патогенності,

визначенні джерел та шляхів потрапляння інфекції при виникненні осередків високопатогенного грипу на території України, а також розробка вітчизняних засобів специфічної профілактики та діагностики.

2. Створено першу вітчизняну вакцину проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ», яка відповідає всім міжнародним стандартам якості та біобезпечності. Завершуються лабораторні дослідження інактивованої асоційованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби, а також гетерологічної вакцини проти грипу птиці з штаму H5N3.

3. Науковцями ННЦ «ІЕКВМ» розроблені та запропоновані для практики чутливі та специфічні тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1-Н14 та «АвіФлуТест H5N1» в РЗГА, а також ПЛР тест-системи для виявлення вірусу.

Список літератури

1. Державний комітет ветеринарної медицини [Електрон. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.vet.org.ua> – Заголовок з екрану
2. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO [Електрон. ресурс] / Спосіб доступу: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_02_15/en/index.html – Заголовок з екрану
3. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int>. – Заголовок з екрану
4. Lee C. W., Suarez D. L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination / Lee C. W., Suarez D. L. // Anim. Health Res. Rev. – 2005. – Vol. 6. – P. 1-15.
5. WHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organization. Avian influenza A (H5N1) infection in humans // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 1374-1385.