



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **471**

(51) **МПК(2011.01) А 61 К**
39/145; С 12 N 7/00; А 61 Р 31/12

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

- (21) 1000518
(22) 05.10.2010
(46) Бюл.66, 2011
(71) Мирзоев Д.М. (TJ); Салимов Т.М. (TJ).
(72) Мирзоев Д.М. (TJ); Салимов Т.М. (TJ); Джавадов Э.Дж. (RU).
(73) Мирзоев Д.М. (TJ); Салимов Т.М. (TJ).
(54) **ВАКЦИНА ПРОТИВ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПОВ Н₅ И Н₇ ИНАКТИВИРОВАННАЯ**
(76) 1. Патент Российской Федерации № RU 2323741. «Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульсионная», 2008 г.
2. Джавадов Э.Д./ Контроль над гриппом птиц/ Джавадов Э.Д., Придыбайло Н.Д., Амдий Э.М., Мирзоев Д.М., Салимов Т. М.,// Доклады ТАСХН.- Душанбе, 2006.-№ 9.-стр.120-123.
3. Ronda E., Garcia-Gancedo A., Alonso M.L. et al. Вакцина против классической чумы птиц, изготовленная из клеток куриного эмбриона, инактивированная бета-пропиолактоном. Матер. IX Меж-

2

дунар. конгресса по микробиологии. Тез. докл., М., 1966, 465.
4.Стандарт, «Вакцина против высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) подтипов Н₅ и Н₇ инактивированная», Санкт-Петербург-Душанбе, 2010 г.
(57) Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии. Вакцина содержит активное вещество и целевую добавку. В качестве активного вещества вакцина содержит очищенный и авирулентный антигенный материал из штамма «Приморский» типа А, подтип Н₅Н₂, инфекционный тип вируса 8,2 lg ЭИД₅₀/см³, эмбриональную жидкость- 10-суточные эмбрионы SPF(СПФ)-кур, инфекционный тип – 8,45 ЭИД₅₀/см³, гемагглютинирующий тип – 7,0 log₂ BCG β-пропиолактон в концентрации, масляный адъювант марки Montanide ISA-70 VG фирмы «Seppic» (Франция).
Вакцина обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью и способна обеспечить эффективную защиту птицы от эпизоотического вируса подтипа Н₅ и Н₇, а также предотвратить выделение иммунизированной птицей возбудителя инфекции в окружающую среду.

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, применяющиеся в ветеринарии для специфической профилактики высокопатогенного гриппа птиц (ГП) подтипов H_5 и H_7 .

Наиболее близкой к предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков является вакцина против ГП инактивированная эмульсионная, содержащая активное вещество в виде очищенного и авирулентного антигенного материала из штамма «Новосибирский» ГП типа А, подтипа H_5N_1 , полученного в 10-12-суточных эмбрионах SPF-кур с инфекционной активностью не менее $9,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ и ГА-активностью не менее 1:64, и целевую добавку в виде масляного адьюванта в соотношении, мас.%, 30:70-40:60 [1].

Целью изобретения является расширение арсенала вакцин против гриппа птиц инактивированных, обладающих высокой антигенной и иммуногенной активностью, обеспечивающих эффективную защиту домашней птицы против вируса (ВПГП) подтипа (H_5 и H_7) и предотвращающих выделение вакцинированной птицей возбудителя инфекции в окружающую среду.

Поставленная цель достигается созданием вакцины против ГП инактивированной эмульсионной, охарактеризованной следующей совокупностью признаков.

Предлагаемая вакцина содержит активное вещество в виде очищенного и авирулентного антигенного материала из штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтип H_5 и H_7 , инфекционный титр вируса $8,2 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, эмбриональную жидкость- 10-суточные эмбрионы SPF(СПФ)-кур, инфекционный титр – $8,45 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, гемагглютинирующий титр – $7,0 \lg$, BCG β – прополилактон в концентрации, масляный адьювант Монтанид ИЗА 70 VG (фирма «Селпио», Франция).

Штамм «Приморский» типа А, подтип H_5N_2 , проявляет высокую биологическую, антигенную и иммуногенную активность как в нативном виде, так и после инактивации.

Штамм предназначен для получения диагностических сывороток и антигенных препаратов, а также для изготовления инактивированной вакцины против вируса ГП.

Штамм «Приморский» вируса гриппа птиц является стабильным, обладает высокой вирулентностью и адаптирован к размножению в эмбрионах кур.

Совместно с ГНУ ВНИВИП Россельхозакадемии и Ветеринарным институтом ТАСХН разработан стандарт (СТО 00495674-003-2006), который устанавливает требования к вакцине [2].

Техническая новизна предлагаемой вакцины состоит в том, что в отличие от прототипа вакцина состоит из гетерогенных штаммов H_5N_2 , H_7N_1 а также её можно создать в виде моновалентной H_5N_2 и H_7N_1 и в виде бивалентной (H_5N_2 , H_7N_1).

Для изготовления вакцины в качестве чувствительной биологической системы используют штамм тип А, H_5N_2 10-суточные эмбрионы SPF-кур, инфекционный титр – $8,45 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, гемагглютинирующий титр – $7,0 \lg$.

Экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) очищают от балластных примесей центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 10-15 мин. После центрифугирования вирусный материал сливают в 10-20-литровые бутылки и подвергают инактивации.

Перед инактивацией инфекционная активность вируса должна быть не ниже $9,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, а ГА-активность не ниже $7,0 \lg$.

Для инактивации вируса используют BCG β -прополилактон. BCG β -прополилактон добавляют в вирусосодержащую суспензию при перемешивании в виде 10%-ного раствора, а бета-прополилактон до конечной концентрации 1:2000-1:4000. Инактивацию вируса проводят в течение 24 часов при температуре от 20 до 37°C . По окончании инактивации BCG β -прополилактон нейтрализуют внесением тиосульфата натрия в суспензию антигенного материала.

После контроля на стерильность и авирулентность антиген подвергают повторной очистке от балластных примесей, пропуская его через промежуточную центрифугу ОТР-102К-01 при 15000-17000 об/мин со скоростью подачи антигена 40-50 л/час и фильтровальную установку.

Очищенный и авирулентный антигенный материал должен иметь ГА-активность не менее 1:64 и pH в пределах 7,2-7,4. Вакцину получают путем диспергирования очищенного и авирулентного антигенного материала с масляным адьювантом в соотношении 30:70 по весу.

Стандарт, «Вакцина против высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) подтипов H_5 и H_7 инактивированная», Санкт-Петербург-Душанбе, 2010 г [3].

Полученная вакцина представляет собой однородную эмульсию белого цвета типа «вода в масле».

Допускается в верхней части флакона наличие слоя масляного адьюванта. При интенсивном встряхивании однородность содержимого легко восстанавливается.

Предлагаемое изобретение включает следующую совокупность существенных признаков, обеспечивающих получение технического результата во всех случаях, на которые испрашивается правовая охрана.

1. Вакцина против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H_5 и H_7 , инактивированная предназначена для вакцинации.

2. Активное вещество в виде очищенного и авирулентного антигенного материала из штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа H_5 и H_7 в эффективном количестве.

3. Целевая добавка в виде масляного адьюванта марки Montanide ISA-70 VG фирмы «Seppic» (Франция).

Признаками изобретения, характеризующими предлагаемую вакцину и совпадающими с признаками прототипа, являются:

1. Вакцина против ГП инактивированная.
2. Содержит активное вещество в эффективном количестве.
3. Целевая добавка в виде масляного адьюванта.

По сравнению с вакциной-прототипом существенным отличительным признаком предлагаемого изобретения является то, что в качестве активного вещества она содержит очищенный и авирулентный антигенный материал из штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа H_5 и H_7 в эффективном количестве.

Предлагаемое изобретение характеризуется также другими отличительными признаками, выражающими конкретные формы выполнения или особые условия его использования:

1. Вакцина состоит из двух антигенов (H_5N_2 ; H_7N_1), а у прототипа один антиген (H_5N_1). Вакцина гетерогенна по N-антигенным в (H_5N_1).

2. Очищенный и авирулентный антигенный материал из штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа H_5N_7 , полученный в 10-12-суточных эмбрионах SPF-кур с инфекционной активностью не менее $9,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{мл}$ и ГА-активностью не менее 1:64, в количестве 30,0 мас.%.
3. В качестве целевой добавки вакцина содержит масляный адъювант марки Montanide ISA-70 VG фирмы «Seppic» (Франция), обеспечивающем толерантную презентацию антигена в организме иммунизированной птицы.

4. Вакцина содержит масляный адъювант в количестве до 100,0 мас.%.
5. Вакцина содержит очищенный и авирулентный антигенный материал из штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа H_5 и H_7 и масляный адъювант в соотношении, мас.%:

Антигенный материал	мас.	30,0
Масляный адъювант	до	100,0

Сыворотку крови получают от всех цыплят опытной и контрольной групп до вакцинации и через 28 суток после прививки для выявления специфических антител.

Для удаления термолабильных ингибиторов исследуемые сыворотки разводят на стерильном физиологическом растворе в 4 раза и прогревают на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут.

Исследования сывороток в РТГА проводят согласно инструкции по применению соответствующего набора. Исследуют индивидуальные сыворотки, полученные от цыплят контрольной и опытных групп до и после вакцинации.

Вакцину считают антигенной активной, если через 28 суток после вакцинации уровень сывороточных антител к вирусу ГП (как подтипа H_5 , так и подтипа H_7) у 90 % привитых цыплят будет иметь значение не ниже, чем $5 \log_2$ (1:32). При этом титры антител к вирусу (ВППТ) у цыплят контрольной группы в течение всего опыта должны отсутствовать.

Вакцину получают путем диспергирования очищенного и авирулентного антигенного материала с масляным адъювантом в соотношении 30:70 по весу.

Содержание антигенного материала и масляного адъюванта в прививной дозе вакцины в соотношении, мас.%, 30:70 является оптимальным, так как обеспечивает толерантную презентацию антигена в организме иммунизированной птицы.

Вакцину считают безвредной, если все цыплята в течение срока наблюдения останутся живыми, без клинических признаков переболевания. При вскрытии птицы на месте введения вакцины не должно быть ярко выраженной воспалительной реакции и некроза тканей. Допускается остатков нерассосавшегося адъюванта.

Внешний вид, полученной вакцины, белого цвета (допускается оттенки сероватого, розоватого или желтоватого) типа «вода-масло», дисперсная фаза которой содержит один из инактивированных антигенов вируса высокопатогенного гриппа птиц подтипов H_5 и H_7 , или их смесь, а дисперсионная среда-масляный адъювант.

Допускается в верхней части флакона наличие слоя масляного адъюванта. При интенсивном встряхивании однородность содержимого легко восстанавливается. Не допускается наличие прозрачного, бесцветного или желтоватого оттенка слоя жидкости на дне флакона (посторонние примеси, плесень).

Стерильность вакцины определяют методом бактериологического контроля стерильности, она должна быть стерильна.

Стабильность вакцины определяют методом центрифугирования образца вакцины, высота столба прозрачной фракции не должна превышать 30 мм.

Контагиозность – контагиозна, неиммунные цыплята заражаются при совместном содержании с зараженными. Контаминация бактериальной и грибной микрофлорой должна отсутствовать.

Вязкость вакцины в пределах $20-150 \text{ мм}^2/\text{с}$, полностью инактивированна безвредна.

Антигенная активность на 28 суток после вакцинации, титр в РТГА не ниже 1:32.

Иммуногенная активность 90% защиты.

Реактогенность - реактогенными свойствами не обладает. Иммунизация цыплят дозой, в два раза превышающей прививную, не вызывает видимых клинических изменений в общем состоянии птицы, а также локальных поражений ткани в месте введения.

Патогенность - высокая (внутриклеточный индекс 2,87, что соответствует высокопатогенным штаммам вируса ГП).

Вирулентность - 100% гибель внутримышечно зараженных цыплят в дозе $10^{6,0} \text{ ЭЛД}_{50}$.

Онкогенность - отсутствует.

Результаты проведенных испытаний показали, что предлагаемая вакцина обладает высокой инфекционной антигенной и иммуногенной активностью после инактивации и обеспечивает надежную защиту домашней птицы против высокопатогенного гриппа птиц (ВППТ) подтипов H_5 и H_7 инактивированной, а также предотвращает выделение вакцинированной птицей возбудителя инфекции в окружающую среду.

Антигенную и иммуногенную активность вакцины (ВППТ) подтипа H_5N_7 оценивают по результатам серологических исследований иммунизированной птицы.

Результаты контроля вакцины на антигенную активность по уровню титров антител

Пример 1. Для проверки антигенной активности вакцины 10 цыплятам 45 дневного возраста однократно подкожно в область верхней трети шеи вводят препарат в объеме одной дозы ($0,5 \text{ см}^3$). 10 инактивных цыплят оставляют в качестве контроля.

Через 14 недель после вакцинации у всех цыплят брали кровь, получали сыворотки и исследовали их на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипов H_5 и H_7 в РТГА. Результаты опыта на антигенную активность по уровню титров антител приведены в таблице 1.

При постановке реакции использовали антигены для диагностики гриппа птиц (H_5N_3 и H_7N_3) производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов» и те же антигены, которые использовали при изготовлении опытных образцов вакцин.

Таблица 1

Антигенная активность инактивированной эмульгированной вакцины против ГП

№ п/п	Группа	Вакцинальная доза, см	Колич. голов	Средний геометрический титр в РТГА, $\log_2$
				Дни после вакцинации, суточные
				14
1	Вакцинированная	0,5	10	2,6±03
2	Контрольная		10	н/о

Таким образом, как видим из таблицы, полученные средние титры антител к вирусу гриппа птиц у цыплят опытных групп значительно превышают минимальный протективный титр, что свидетельствует о высокой антигенной и иммуногенной активности испытуемых образцов инактивированных вакцин.

Испытания иммуногенной активности вакцины против ВПГП подтипов Н₅ и Н₇ инактивированной эмульгированной (бивалентной) методом контрольного заражения

Пример 2. В опыте были использованы:

- вакцина против ВПГП подтипов Н₅ и Н₇ инактивированная эмульгированная (бивалентная), серия №1, изготовленная так, как описано в примере 2;

- 40 голов цыплят-бройлеров 25-дневного возраста, не имеющие специфических антител к антигенным детерминантам вируса гриппа А птиц. - вирус гриппа А птиц подтип Н₅Н₂, 4 пассаж, биологическая активность 8,5 lg ЛД₅₀/см³ и 9,75 lg ЭЛД₅₀/см³, гемагглютинирующая активность 1:32;

Цыплята были разбиты на 4 группы по 10 голов в каждой:

1 группа – вакцину вводили каждому цыпленку подкожно в область средней трети шеи однократно, в дозе 0,5 см³ согласно инструкции по применению;

2 группа – физиологический раствор подкожно в объеме 0,5 см³ однократно (контроль вируса);

3 группа – контроль патогенности при контактом способе заражения;

4 группа – контроль содержания и кормления.

Птицу 4-й группы содержали изолированно от первых трех групп.

Перед вакцинацией, а также через 14 и 28 дней после вакцинации (перед заражением 2-й группы) у цыплят отбирали кровь для получения сыворотки и определяли уровень специфических антител в РТГА к вирусу гриппа А птиц.

Пример 3. На 28 день с начала опыта цыплятам-бройлерам 2-й группы внутримышечно ввели вирус гриппа А птиц с антигенной формулой Н₅Н₁ в дозе 100 ЛД₅₀, однократно в объеме 1,0 см³. Инфицированных цыплят в тот же день подсадили к цыплятам 1 и 3-й групп.

Их содержали совместно в одном боксе напольно, на несменяемой подстилке, а перед взятием крови на 28 день окольцевали.

Для определения уровня накопления вируса в пробах из клоаки цыплят, иммунизированных вакциной и зараженных высокопатогенным вирусом гриппа А птиц подтип Н₅Н₂ были отобраны:

- 2 пробы (№ 40 и № 41) из клоаки от вакцинированных цыплят, отобранные на 2 сутки после контрольного заражения;

- 6 проб (№№ 40, 41, 42, 44, 48, 49) из клоаки от вакцинированных цыплят, отобранные на 3 сутки после контрольного заражения;

- 2 пробы (№ 1 и № 2) из клоаки от контрольных (не вакцинированных) цыплят на 2-е сутки после контрольного заражения;

Использовали по 4 куриных эмбриона на 1 разведение материала. Доза введения – 0,2 см³. Пробы клоаки от вакцинированных цыплят исследовали в разведениях – 10⁻¹, 10⁻² и 10⁻³. Пробы клоаки от контрольных цыплят исследовали в разведениях 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ и 10⁻⁶. Ежедневно проводили овоскопию эмбрионов на предмет гибели. Погибшие эмбрионы помещали в холодильник при (2-8)°С. Погибшие и все оставшиеся в живых эмбрионы через 5 суток после введения материала (после охлаждения) были исследованы в РГА, этими исследованиями подтверждали специфичность гибели эмбрионов. За птицей проводили ежедневное наблюдение дважды в сутки (10⁰⁰ и 16⁰⁰), фиксируя отклонения от физиологической нормы. Наблюдение проводили в течение 10 дней после контрольного заражения, регистрируя заболеваемость, смертность, летальность.

Результаты опыта по контрольному заражению приведены в таблице 2.

Таблица 2

Динамика падежа птицы после контрольного заражения

Группы №	Дни наблюдений										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2	0/10	5п/10	10п/10	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0/10	0/10	0/10	0/10	5п/10	10п/10	-	-	-	-	-
4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Примечание: в числителе – количество больной (б) и павшей (п) птицы,
в знаменателе – количество птицы в опыте.

Из данных табл.2, следует, что вакцина предохраняет от вируса гриппа А птиц, подтип H₅N₂ - 100% поголовья птицы. В контрольной зараженной группе все цыплята пали на 2-3-4 день, а в контрольной группе при контактном способе заражения – 4-5-й день наблюдения.

Пример 4. Специфичность гибели цыплят-бройлеров от вируса гриппа А птиц подтип H₅N₂ подтверждена на основании данных обнаружения

и идентификации специфического антигена вируса гриппа с помощью “Набора препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла твердофазным иммуноферментным методом” (ТУ 9388-053-00495549-02) в пробах органов (селезенка, желудок, легкие, кишечник, головной мозг, почки, печень).

Результаты определения титра специфических антител в сыворотках крови после 14 и 28 суток после начала основного опыта, представлены в таблице 3.

Таблица 3

Сероконверсия антител в РТГА у цыплят вакцинированных и контрольных групп

Группы цыплят, пробы № 1-10		
Титр через 14 суток в РТГА		
1 вакцина ВНИВИП однократно	2 контроль заражения	3 контроль патогенности
№ 1 – 1:16	№ 1 – 0	№ 1 – 0
№ 2 – 1:16	№ 2 – 0	№ 2 – 0
№ 3 – 1:128	№ 3 – 0	№ 3 – 0
№ 4 – 1:16	№ 4 – 0	№ 4 – 0
№ 5 – 1:16	№ 5 – 0	№ 5 – 0
№ 6 – 1:8	№ 6 – 0	№ 6 – 0
№ 7 – 1:32	№ 7 – 0	№ 7 – 0
№ 8 – 1:8	№ 8 – 0	№ 8 – 0
№ 9 – 1:64	№ 9 – 0	№ 9 – 0
№ 10 – 1:16	№ 10 – 0	№ 10 – 0
Титр через 28 суток в РТГА перед контрольным заражением		
№ 1 – 1:32	№ 1 – 0	№ 1 – 0
№ 2 – 1:16	№ 2 – 0	№ 2 – 0
№ 3 – 1:128	№ 3 – 0	№ 3 – 0
№ 4 – 1:16	№ 4 – 0	№ 4 – 0
№ 5 – 1:64	№ 5 – 0	№ 5 – 0
№ 6 – 1:64	№ 6 – 0	№ 6 – 0
№ 7 – 1:32	№ 7 – 0	№ 7 – 0
№ 8 – 1:16	№ 8 – 0	№ 8 – 0
№ 7248 – 1:128	№ 9 – 0	№ 9 – 0
№ 7249 – 1:32	№ 10 – 0	№ 10 – 0

11

471

12

Представленные в таблице 3 результаты исследования сывороток крови цыплят 1 группы показывают, что через 14 дней после вакцинации у 80% цыплят были титры 1:16 и выше, а через 28 дней – они увеличились до 100%. У цыплят контрольных групп (2 и 3) титры антител не выявлялись.

Через 10 дней после заражения у вакцинированной птицы, перед выводом ее из опыта, была получена сыворотка, с целью определения уровня прироста специфических антител к вирусу гриппа А птиц. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Титры антител у вакцинированных зараженных ВПГП цыплят по результатам РТГА.

№ цыплят	Титр антител
1	1:32
2	1:64
3	1:256
4	1:32
5	пал
6	1:32
7	1:64
8	1:128
9	1:128
10	1:32

Как явствует из данных таблицы 4., у вакцинированных и зараженных цыплят наблюдается 2-4-х кратное увеличение сероконверсии антител.

Были также определены уровни накопления антигена в отобранных клоакальных пробах вак-

цинированных и зараженных патогенным вирусом цыплят, а также у цыплят зараженного контроля, контроля интактных эмбрионов и эмбрионов, которым вводили только физ. раствор.

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Титры антигена в клоакальных смывах вакцинированных и зараженных цыплят и эмбрионов.

№ пробы	Разведение материала и результат РГА					Титр вируса ЭИД ₅₀ /см ³ lg
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
№ 40 – 2 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 41 – 2 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 40 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 41 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 42 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 44 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 48 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 49 – 3 сутки	----	----	----	н.и.	н.и.	<0,5
№ 1 – 2 сутки	+++ п	+++ п	+++ п	+++ п	++++	>6,2
№ 2 – 2 сутки	+++ п	+++ п	+++ п	++++	++++	>6,2
Контроль эмбрионов	----	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	0
Контроль физ. р-ра	----	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	0

13

471

14

Примечание: + - положительный результат в РГА; - - отрицательный результат в РГА; п. – пал, н.и. – не исследовали.

Из представленных данных табл.5., видно, что титр вируса в группе вакцинированных и зараженных патогенным вирусом цыплят на 2 и 3 сутки был минимальным (менее 0,5 lg ЭИД₅₀/см³, в то время как в группе зараженного контроля – 6,21 lg ЭИД₅₀/см³).

В группах эмбрионов, используемых в качестве контроля (физиологический раствор и интактные) вирус не обнаружен.

Пример 5.

Исследовано формирование иммунитета к гриппу птиц у цыплят разного возраста после вакцинации препаратом (серия 01), изготовленным так, как описано в примере 2.

Формирование иммунитета к гриппу птиц у цыплят разного возраста изучали на 4 опытных (n=10) и 4 контрольных (n=10), свободных от антител к вирусу гриппа группах цыплят в возрасте 1; 10; 20 и 30 сут. Цыплят опытных групп иммунизировали вакциной против ВПП подтипов Н₅ и Н₇ инаktivированной эмульгированной (бивалентной) подкожно в область средней трети шеи в объеме 0,3 см³ суточных цыплят и 0,5 см³ цыплят других возрастов.

Результаты определения активности антител к ГП в РТГА свидетельствуют (табл. 5), что вакцина против высокопатогенного гриппа птиц подтипов Н₅ и Н₇ инаktivированная обладает высокой антигенной активностью и способна вызывать формирование антиагглютинирующих антител у вакцинированных цыплят различных возрастов.

Таблица 6

Среднегрупповые титры антиагглютинирующих антител (log₂) у цыплят разного возраста к гриппу птиц, привитых вакциной против высокопатогенного гриппа птиц подтипов Н₅ и Н₇, log₂

Возраст цыплят, сут.	Группа		Срок после иммунизации, сут.	
			30	60
1	контрольная		0	0
	опытная	H ₅ N ₂	9,3	8,9
		H ₇ N ₁	9,65	9,2
20	контрольная		0	0
	опытная	H ₅ N ₂	9,2	9,4
		H ₇ N ₁	9,1	9,5
45	контрольная		0	0
	опытная	H ₅ N ₂	9,8	9,5
		H ₇ N ₁	10,0	9,7
80	контрольная		0	0
	опытная	H ₅ N ₂	10,1	9,1
		H ₇ N ₁	10,8	9,4

Пример 6.

Антигенную активность вакцины против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H₅ и H₇ инактивированной (серия 02), изготовленной так, как описано в примере 1, изучали на цыплятах 45-суточного возраста, свободных от антител к вирусу гриппа птиц, из которых сформировали две группы (n=15). Цыплят опытной группы иммунизировали однократно подкожно в среднюю треть шеи в объеме 0,5 мл, птица контрольной группы была непривитой. Срок наблюдения составлял 360 дней

Напряженность и продолжительность иммунного ответа изучали по антигенной активности вакцины против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H₅ и H₇ инактивированной (серия 02),

изготовленной так, как описано в примере 2. Для этого цыплят 45-суточного возраста, свободных от антител к вирусу гриппа птиц, (n=15) иммунизировали бивалентной вакциной, оставляя контрольную группу цыплят (n=15) интактной.

Исследование проводили в течение 360 дней, каждый месяц отбирая пробы крови и исследуя полученные сыворотки в РТГА.

Результаты определения активности антител к ГА в РТГА свидетельствуют (табл. 7), что вакцина против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H₅ и H₇ инактивированная обладает высокой антигенной активностью и способна вызывать формирование напряженного и продолжительного иммунитета к гриппу птиц типа А.

15

471

16

Таблица 7

**Антигенная активность (среднегрупповые титры
антигемагглютинирующих антител, log₂) вакцины
против высокопатогенного гриппа птиц подтипов H₅ и H₇**

Группа		Срок после иммунизации, сут.													
		0	14	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Контрольная		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Опытная	H ₅ N ₂	0	4,5	7,9	7,7	9,2	9,8	9,6	9,6	8,3	8,2	8,5	8,3	8,2	8,1
	H ₇ N ₁	0	4,3	8,7	8,7	9,3	9,6	9,7	9,6	8,5	8,1	8,5	8,2	8,1	7,9

а). Вакцина безвредна.

б). Однократная вакцинация индуцирует выработку защитных антител через 21 сутки.

в). Вакцина обладает 100% протективной эффективностью.

Таким образом, результаты данного эксперимента показали высокую вирулентность штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа H₅ и H₇

способность передаваться алиментарным путем и вызывать гибель неиммунных цыплят.

В то же время вакцинированные цыплята были полностью защищены от заражения вирулентным вирусом, что доказано отсутствием клинических признаков заболевания и отсутствием его репликации.

Таким образом, приведенная информация свидетельствует о выполнении при использовании предлагаемой вакцины следующей совокупности условий:

- вакцина против ГП инактивированная, предназначена для использования в сельском хозяйстве, а именно в ветеринарной вирусологии и биотехнологии;

- вакцина против ГП инактивированная, изготовленная на основе штамма «Приморский» вируса ГП типа А, подтипа Н₅ и Н₇, обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью и способна обеспечить эффективную защиту восприимчивой птицы от эпизоотического вируса подтипа Н₅ и Н₇, а также предотвратить выделение иммунизированной птицей возбудителя инфекции в окружающую среду.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцина против высокопатогенного гриппа птиц инактивированная, содержащая активное вещество и целевую добавку, *отличающаяся тем, что* в качестве активного вещества содержит очищенный и авирулентный антигенный материал из штамма «Приморский» типа А, подтипов Н₅ и Н₇ в следующем соотношении компонентов, мас. %:

Антигенный материал	30,0
Масляный адъювант	до 100,0

Компьютерный набор: Назарова Дж.Д.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.		