

УДК 619:616.98:578.822.2:636.7

Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН Беларуси

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор

Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА СОБАК

### Резюме

В работе приводятся данные литературы и собственные исследования авторов по проблеме инфекционного гепатита собак в мире и в Республике Беларусь, а также методические подходы при конструировании вакцины и ее эффективности при лабораторных и производственных испытаниях.

### Summary

The paper presents the literature data and the authors own research on the problem of infectious hepatitis dogs in the world and in the Republic of Belarus, as well as methodological approaches in the design of the vaccine and its effectiveness in laboratory and production tests.

Поступила в редакцию 09.03.2016 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный гепатит собак (*Contagios canine hepatitis*, *Infectious canine hepatitis*, *Canine viral hepatitis*, *Rubarths disease* (англ.); *Maladie de Rubarth* (франц.), *Rubarthsche Krankheit* (нем.)) – заразное воспаление печени собак, болезнь Рубарта, вирусный гепатит – остро-контагиозная болезнь, протекающая с лихорадкой, воспалительными процессами конъюнктивы, слизистой оболочки носовой полости, желудочно-кишечного тракта, печени и желчного пузыря, иногда сопровождающаяся нарушением деятельности центральной нервной системы.

Инфекционный гепатит собак (ИГС) зарегистрирован во многих странах мира, а также широко распространен в странах СНГ, в том числе и в Республике Беларусь. Для его характерно длительное (в течение нескольких лет) вирусоносительство. Скрытыми носителями вируса могут быть мыши, обезьяны, человек. Резервуар возбудителя – бродячие собаки и дикие звери. Источник возбудителя – больные животные и вирусоносители, выделяющие вирус с мочой, носовой слизью, калом, конъюнк-

тивальным секретом от нескольких недель до нескольких месяцев. Заражение происходит как при непосредственном контакте здоровых животных с больными, так и посредством эктопаразитов (вшей, блох). По некоторым данным, естественное заражение происходит через слизистые оболочки носовой и ротовой полостей, ЖКТ и половые органы. Установлены случаи распространения болезни при несоблюдении правил асептики и антисептики во время хирургических операций, прививок, взятия крови и др. [1–7].

Эпизоотии инфекционного гепатита носят сезонный характер, но чаще наблюдаются весной и летом при появлении молюска. Спорадически же болезнь встречается в любое время года, что связано, в основном, с обострением латентного или хронического течения болезни под влиянием каких-либо неблагоприятных факторов. Заболеваемость и летальность значительно колеблются и зависят от состояния сопротивляемости организма и условий содержания животных. Самки-вирусоносители в течение ряда лет могут заражать своих щенков, а также самцов-производителей.

Возбудитель болезни – DNA-содержащий вирус (*Adenovirus caninae*) отнесён к обширной группе аденовирусов, роду *Mastadenovirus*. Предположение о вирусной природе болезни впервые высказал Каудри в 30-х гг., а в 1947 г. Рубарт подтвердил её экспериментально. При изучении эпизоотий энцефалита лисиц, которые наблюдались с 1925 г. в течение ряда лет, многими исследователями выделен вирус, который был назван вирусом энцефалита лисиц. В настоящее время он известен как аденовирус собак типа 1 (CAV-1).

Вирус CAV-2 был впервые изолирован от группы собак при вспышке ларинготрахеита (кашля в питомнике) и был определён как один из этиологических агентов этой болезни. Аденовирус собак CAV-2 перекрёстно нейтрализуется антисывороткой CAV-1. Вирус однороден в иммунобиологическом отношении [6].

Вирус ИГС устойчив к физико-химическим факторам. При замораживании, высушивании и хранении в 50%-ном растворе глицерина он не теряет своих свойств 3–5 лет. При температуре 37°C сохраняется до 29 дней, при комнатной температуре – 10–13 недель, при температуре 4°C – более 9 месяцев. Высокая температура действует на вирус губительно. Он теряет вирулентность при нагревании до 100°C за 1 минуту. Вирус неустойчив к формалину, лизолу, фенолу, свежегашёной извести, эти средства инактивируют его в течение 30 мин. Проявляет выраженную устойчивость к эфиру, хлороформу, метанолу, антибиотикам и УФ лучам.

На волосяном покрове шкуры жизнеспособность его колеблется в широких пределах в зависимости от температуры окружающего воздуха. Так, при температуре 17°C вирус инактивировался в интервале между 22–30 днями, при температуре 0–2°C – между 168–184 днями и при температуре 1–8°C – между 246–263 днями. Его выделяли с волосяного покрова собак во время клинического проявления болезни и спустя 35 дней после переболевания [5].

Вирус индуцирует образование ви-

руснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих и антигемагглютинирующих антител.

Инфекционный гепатит собак представляет серьезную угрозу для служебного собаководства и индивидуальных владельцев собак, а также потенциальную опасность для пушного звероводства. Вопросы эпизоотологии, клинико-морфологического проявления, диагностики и профилактики указанного заболевания достаточно изучены [1–10]. Однако со стороны государственной ветеринарной службы Республики Беларусь этому заболеванию уделяется недостаточное внимание, не ведется его официальная статистика, в республике не производятся диагностикумы и вакцины.

В зарубежных странах такие препараты разработаны и производятся. Для активной специфической профилактики используют ассоциированные вакцины: Биовак-DPAL, Пентавак, Гексаканивак, Тривирикан и др. Из зарубежных ассоциированных вакцин применяют Бивировакс, Тривировакс, Гексадог (Франция), Вангард-5, 7 (США) и др. Закупкой и реализацией их в нашей стране в ограниченных масштабах занимаются частные ветеринарные клиники и аптеки, что значительно удорожает стоимость препаратов, объемы и эффективность их применения, а также требует затраты валютных средств.

Поэтому разработка и налаживание производства отечественных диагностикумов и вакцин против инфекционного гепатита собак является важной практической задачей.

**Целью** наших исследований было конструирование жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против инфекционного гепатита собак и разработке рациональной технологии ее производства.

Для реализации указанной цели решались следующие задачи: изыскание рациональных способов получения вирусного сырья для изготовления вакцины; отработка методов и режимов инаktivации виру-

са; определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине; конструирование вакцины и изучение ее безвредности, стерильности, и иммуногенности; изучение срока годности вакцины; разработка ТНПА на вакцину.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на нелинейных белых мышах, кроликах породы Шиншилла, преимущественно самцах, массой 2–3 кг и серонегативных собаках различных пород массой 10–15 кг в условиях вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вивария УО Белорусский государственный медицинский университет, приюте для безнадзорных животных г.Минска «Фауна города», горветстанциях республики.

В работе использовали вирус инфекционного гепатита плотоядных штамм КМИЭВ-83, который селекционирован из выделенного эпизоотического штамма от больной инфекционным гепатитом собаки, и адаптирован к перевиваемой культуре клеток МДСК. Указанную культуру клеток использовали для накопления вирусного сырья при производстве вакцины.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение вирусного сырья для изготовления вакцины.* Культивирование вируса для изготовления вакцины проводили роллер-

ным в 2-литровых роллерах или статическим в 1,5-литровых матрасах способами при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Скорость вращения роллеров от 12 до 28 об/мин. В качестве питательной среды использовали среды Игла или Игла МЕМ с добавлением 2; 5 или 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Вирус вносили в питательную среду одновременно с клетками, концентрация которых составляет  $0,1-0,2$  млн/см<sup>3</sup>. Для культивирования вируса инфекционного гепатита использовали клетки МДСК. Заражающая доза вируса  $-0,1-0,3$  ТКИД<sub>50</sub>/кл.

Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. «Урожай» собирали через 3–4 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость матрасы и роллеры замораживали при минус  $18-20^\circ\text{C}$  в течение 18 и более часов. Нарботанный вирусный материал проверяли на титр вируса, бактериальную и грибковую контаминацию по общепринятым методикам. Весь вирусный материал был стерильным в отношении бактериальной и грибковой флоры. Наибольшее накопление вируса происходило при роллерном способе культивирования по сравнению со статическим (таблица 1).

Таблица 1 – Накопление вакцинного вируса инфекционного гепатита плотоядных при различных способах культивирования

Наименование вируса	Наименование культур клеток	Титр вируса при культивировании, lg	
		роллерным способом	в статических условиях
вирус инфекционного гепатита	МДСК	$4,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$

Примечание – титр вируса указан в ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; данные приведены по 3-м повторностям

Как видно из таблицы 1, наиболее высокое накопление вируса происходило при роллерном способе выращивания. Титр вируса при этом составил  $5,0 \pm 0,1$  или на  $0,5$  lg выше, чем при стационарном способе культивирования.

*Отработка метода инактивации вируса.* Инактивацию вируса проводили теотропином, который добавляли к нему до конечной концентрации 0,05; 0,1 и 0,15% и выдерживали в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$ , периодически перемешивая. Через

0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность путем заражения культуры клеток МДСК. Опыт проводили в 3-х повторностях.

В результате было установлено, что

теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре 37°C полностью инактивировал вирус. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титр вируса (таблица 2).

Таблица 2 – Биологическая активность вируса инфекционного гепатита плотоядных после инактивации теотропином

№ п/п	Концентрация теотропина, %	Титр вируса до инактивации	Время инактивации, часов	Титр вируса после инактивации
1	0,05	4,5±0,2	12	4,4±0,2
2	0,1	4,5±0,2		4,0±0,2
3	0,15	4,5±0,2		3,4±0,2
4	0,05	5,0±0,2	24	2,5±0,2
5	0,1	5,0±0,2		0
6	0,15	5,0±0,2		0
7	0,05	5,0±0,1	36	1,5±0,1
8	0,1	5,0±0,1		0
9	0,15	5,0±0,1		0

Примечание – титры вируса указаны в lg

В дальнейшей своей работе для инактивации вакцинного вируса мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина, как более полную гарантирующую результат.

*Определение оптимальной концентрации геля гидроксида алюминия (гидроксала) для конструирования вакцины.* С целью определения оптимальной концентрации гидроксала для конструирования вакцины в культуральную жидкость вируса инфекционного гепатита добавляли его в концентрации 5 и 10%. Затем смесь виру-

са с различной концентрацией гидроксала выдерживали, помешивая, в течение 18 часов в холодильнике при температуре 4°C и центрифугировали при 4000 об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную жидкость вируса титровали на культуре клеток МДСК. С целью контроля титрации одновременно подвергали и исходный вирус без добавления гидроксала. Оптимальной считалась та концентрация гидроксала, при которой он максимально сорбировал вирус. Опыт проводили в 3 повторностях (таблица 3).

Таблица 3 – Титры вируса инфекционного гепатита плотоядных в надосадочной жидкости после его сорбции гидроксалом

№ п/п	Количество гидроксала в смеси с вирусом, об.%	Время сорбции, часы	Температура сорбции, °C	Титры вируса в надосадочной жидкости
1	5	18	4	4,5±0,2
2	10	18	4	2,0±0,2
3	Без гидроксала	–	–	5,0±0,2

Примечание – титры вируса указаны в lg

Как видно из таблицы 3, оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции вируса является 10 об.%. Титр вируса при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 2,5 lg.

В дальнейшем указанная концентра-

ция гидроксала использовалась нами при изготовлении экспериментального образца вакцины.

*Конструирование экспериментального образца вакцины и изучение ее стерильности, безвредности иммуногенности.*

Для конструирования вакцины использовали вирус инфекционного гепатита плотоядных штамм КМИЭВ-83 с титром  $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  с добавлением 10 об. % гидроксала. Культивировали вирус в клетках MDCK роулерным способом. Инактивацию проводили теотропином в 0,15%-ной концентрации при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  и экспозиции 24 часа. Полноту инактивации определяли путем заражения культуры клеток MDCK. Гидроксал вносили после инактивации вируса.

Бактериальную и грибковую стерильность определяли путем высева вакцины на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабура, безвредность – путем подкожного введения по  $0,5 \text{ см}^3$  вакцины 10-ти белым мышам живой массой 18–20 г. Срок наблюдения 10 суток. О результатах судили по отсутствию роста микроорганизмов и выживаемости животных.

В результате вакцина при подкожном введении белым мышам в течение 10 дней наблюдения не вызвала их заболевания и гибели, что свидетельствует о ее безвред-

ности.

В посевах вакцины на питательных средах по истечении 10 суток рост бактерий и грибов отсутствовал, что свидетельствует о бактериальной и грибковой ее стерильности.

Подбор оптимальной дозы и иммуногенную активность вакцины изучали в опыте на 12 кроликах массой 2,0–2,5 кг. Животные были разделены на четыре группы, по 3 животных в каждой. Животным первой группы была введена сконструированная вакцина в объеме  $0,5 \text{ см}^3$ , второй – по  $1,0 \text{ см}^3$  и кроликам 3 группы – по  $2,0 \text{ см}^3$  вакцины. Четвертая группа кроликов, вакцинированных по  $2,0 \text{ см}^3$  вакцины «Мультикан-8», служила контролем. Препараты вводили дважды с интервалом 21 день.

Через 14 дней после вакцинации сыворотки крови животных были исследованы на титры антител против инфекционного гепатита плотоядных в РН на культуре клеток MDCK. Результаты исследования титров антител приведены в таблица 4.

Таблица 4 – Титры специфических антител у кроликов, вакцинированных различными дозами жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против инфекционного гепатита плотоядных

№ п/п	Группы животных	Объем, $\text{см}^3$	Кол-во животных	Титры антител
1	первая	$0,5+0,5$	3	$6,0\pm 1,0$
2	вторая	$1,0+1,0$	3	$7,0\pm 1,0$
3	третья	$2,0+2,0$	3	$8,0\pm 1,0$
4	контроль (вакцина «Мультикан-8»)	$2,0+2,0$	3	$7,0\pm 1,0$

Как видно из таблицы 4, у кроликов, вакцинированных сконструированной вакциной, титры антител к вирусу инфекционного гепатита на 14 день после иммунизации были относительно высокими, как и у кроликов, вакцинированных вакциной российского производства «Мультикан-8». Наиболее высокими были титры антител у животных при введении вакцины в дозе  $2,0 \text{ см}^3$ , т.е. указанная доза была наиболее эффективной.

Все кролики в течение 40 дней после вакцинации оставались клинически здоровыми, местные реакции в месте введения

вакцины отсутствовали. Проверка иммунологической эффективности экспериментального образца конструируемой вакцины проведена также в комиссионном опыте на собаках. С этой целью 10 собак были разделены на 2 группы, по 5 голов в каждой. Животные первой группы были вакцинированы экспериментальным образцом вакцины двукратно по  $2,0 \text{ см}^3$  с интервалом 21 день. Животные второй группы, для контроля, по такой же схеме вакцинированы вакциной «Мультикан-8». Вакцины вводили внутримышечно в области бедра или подкожно за лопаткой. Наблюдение за жи-

вотными осуществляли в течение 40 дней с оценкой общего состояния и с выборочным измерением температуры. Через 14 дней после вакцинации у животных были отобраны пробы крови для определения титров антител. Об иммунологической эффективности вакцины судили по титрам специ-

фических антител у вакцинированных животных.

Результаты определения иммунологической эффективности сконструированного экспериментального образца вакцины представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Титры специфических антител против вируса инфекционного гепатита плотоядных у собак, вакцинированных сконструированной вакциной

№ группы	Вакцина	Доза, см <sup>3</sup>	Титры антител (log <sub>2</sub> ) через 14 дней после вакцинации
1	сконструированная	2,0+2,0	6,0±1,0
2	Мультикан-8	2,0+2,0	6,0±1,0

Как видно из таблицы, у животных, привитых сконструированной вакциной, титры антител к вирусу инфекционного гепатита плотоядных на 14 день после вакцинации были относительно высокими и не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной «Мультикан-8». Все собаки в течение 40 дней после вакцинации оставались клинически здоровыми, местные реакции в месте введения вакцин отсутствовали. Следовательно, сконструированная вакцина является стерильным, безвредным и иммуногенным препаратом, не уступающим по эффективности российской вакцине «Мультикан-8».

Для установления срока годности сконструированной вакцины общая проба из 3-х ее серий была проверена на иммуно-

генную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре 4–8°C. Исследования проводились по общепринятым методикам. Титры антител к вирусу гепатита определяли у 3 кроликов, вакцинированных сконструированной вакциной с различным сроком хранения внутримышечно в дозе 2,0 см<sup>3</sup>, двукратно с интервалом 21 день. При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 18 месяцев. Однако иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения незначительно снижалась. Поэтому в условиях хранения при 4–8°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 6).

Таблица 6 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против инфекционного гепатита плотоядных через различные сроки хранения (n-3)

№ п/п	Показатели	Сроки хранения (месяцев) и титры антител (log <sub>2</sub> )		
		6	12	18
1	Иммуногенная активность	6±1	5±1*	5±1
2	Стерильность	+	+	+
3	Безвредность	+	+	+

Примечание – «+» – положительный результат; \*P < 0,01

По результатам проведенных исследований была изготовлена промышленная партия вакцины. Производственные испытания иммунологической и противозооэпидемиологической эффективности ее проводились на 810 собаках в ГУ «Фауна города» и на 1090 собаках в райветстанциях Молодеченского

и Воложинского районов Минской области, неблагополучных по бешенству, чуме, парвовирусному энтериту и инфекционному гепатиту плотоядных животных.

Вакцина вводилась внутримышечно в области бедра или подкожно в области шеи в дозе по 2,0 см<sup>3</sup> двукратно с интервалом

20–21 день. За привитыми животными в течение двух недель было установлено патронажное наблюдение.

За это время случаев падежа, каких-либо осложнений или местных реакций, потери аппетита не зарегистрировано.

### ВЫВОДЫ

1 Сконструированная вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против инфекционного гепатита собак является безвредным, стерильным и высокоиммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства и рекомендуется для внедрения в практику.

2 При двукратной, с интервалом 14–21 день, иммунизации кроликов и собак указанной вакциной в объеме по 2,0 см<sup>3</sup> через 14 сут. после повторной иммунизации животные имели аналогичные титры антител (6,0±1), как и при иммунизации коммерческой вакциной «Мультикан-8» (6,0±1).

3 Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает вирус инфекционного гепатита собак КМИЭВ-83 в титре 4,5±0,2 Ig, выращенный в культуре клеток MDCK, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15 %-ной концентрации, в качестве адьюванта – гид-

роксал в концентрации 10 об. %.

4 Способ изготовления вакцины включает репродукцию вируса, его инактивацию, сорбцию и конструирование вакцины.

5 Вирус репродуцируют в культуре клеток MDCK со средой Игла и 5%-ми сыворотками КРС в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре 37°C. Заражающая доза вируса составляла 0,1–0,3 ТЦД<sub>50/кл.</sub> «Урожай» собирают через 3–4 сут. культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

6 Вирусное сырье инактивируют теотропином в 0,15 %-ной концентрации в течение 24 ч при температуре 37°C и добавляют гидроксал до конечной концентрации 10 об. %.

7 Хранение при температуре 4–8°C обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

8 На вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против инфекционного гепатита собак разработаны ТНПА (ТУ, опытно-промышленный регламент, инструкция по применению).

9 Разработанная вакцина одобрена ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр» и рекомендована к производству.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Белов, А.Д. *Болезни собак* /А.Д. Белов [и др.] М., *Агропромиздат*, 1990.–368с.
- 2 Госманов, Р.Г. *Ветеринарная вирусология [Текст]: учебник* / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев; под редакцией. Т.С. Молочаева. – М.: Колос, 2006. – С. 162–164.
- 3 Ковалев, Н.А. *Клинико-морфологическое проявление и профилактика инфекционного гепатита собак* / Н.А. Ковалев [и др.] // *Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария*. –2011.– №3. – С. 3–8.
- 4 Осидзе, Д.Ф. *Инфекционные болезни животных: справочник*. / Д.Ф. Осидзе // М.: ВО «Агропромиздат», 1987. –288с.
- 5 Сюрин, В.Н. *Вирусные болезни животных* / В.Н. Сюрин [и др.] М., ВНИТИБП, 1998.– 928с.
- 6 Фомина, Н.В. *Аденовирусные инфекции животных* / Н.В. Фомина // М, Колос, 1995. В 2-х т. Т.2.– 193 с.
- 7 Шуляк, Б.Ф. *Вирусные инфекции собак* / Б.Ф. Шуляк.– М.: «Олита», 2004.–568с.
- 8 *Инфекционный (вирусный) гепатит собак [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.moksyakova.ru/infektsionnyie-bolezni-sobak/infektsionnyiy-gepatit-sobak.html>*. – 20.12.2015 г.
- 9 *Инфекционный гепатит плотоядных (ИГС) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://rostovvet.ru/price/infectious-hepatitis-carnivores/>* – 20.12.2015 г.
- 10 *Инфекционный гепатит собак [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vetvo.ru/infekcionnyj-gepatit-u-sobak.html>*. – 20.12.2015 г.