УДК 619:616.98:578.822.2:636.7

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор
Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, академик НАН Беларуси
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук
Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

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

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК «ПАРВОВАК»

Резюме

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

Summary

In work these literatures and own researches of authors on a problem of parvoviral enteritis of dogs are given in the world and Republic of Belarus, and also methodical approaches when designing a vaccine and its efficiency at laboratory and production researches.

Поступила в редакцию 24.11.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Парвовирусный энтерит собак – широко распространенная контагиозная болезнь, проявляющаяся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, миокардитом, дегидратацией и гибелью щенков возрастом до 5 месяцев.

К инфекции восприимчивы не только собаки, но и волки, енотовидные собаки, лисицы, песцы, кошки, тигры, гепарды, бурые медведи.

Впервые заболевание было зарегистрировано в Бельгии в 1976 г., затем в США, Австралии, Канаде, Франции, ФРГ, Англии и других странах. Заболевание встречается также в Российской Федерации и странах СНГ, в том числе в Беларуси [1–6]. В Беларуси официальная статистика по этому заболеванию не ведется, поэтому истинные размеры его распространения не известны. Однако нами выявлено несколько его случаев в г. Минске среди домашних собак.

Парвовирусный энтерит представляет серьезную угрозу для служебных собакопитомников и индивидуальных собаководов, а также потенциальную опасность для пушного звероводства. Вопросы эпизоотологии, клинико-морфологического проявления, диагностики и профилактики указанного заболевания достаточно изучены. Однако со стороны государственной ветеринарной службы Республики Беларусь этому заболеванию уделяется недостаточное внимание, не ведется его официальная статистика, не производятся диагностикумы и вакцины.

В зарубежных странах такие препараты разработаны и производятся. 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 парвовирусного энтерита собак является важной практической задачей.

Наши исследования были посвящены конструированию жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против парвовирусного энтерита собак и разработке рациональной технологии ее производства.

Для реализации указанной цели решались следующие **задачи**:

1 Изыскание рациональных способов получения вирусного сырья для изготовления вакцины.

2 Отработка методов и режимов инактивации вируса.

3 Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине.

4 Конструирование вакцины и изучение ее безвредности, стерильности и иммуногенности.

5 Изучение срока годности вакцины.

6 Разработка ТНПА на вакцину.

МАТЕРИАЛ 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 работе использовали вирус парвовирусного энтерита собак штамм КМИЭВ-14в, который селекционирован из выделенного от собак эпизоотического штамма и адаптирован к культурам клеток CRFK. Указанную культуру клеток использовали и для накопления вирусного сырья при производстве вакцины.

Для **выявления и титрования вируса** парвовирусного энтерита собак применяли диагностические наборы «Парвотест» и ИФА производства компании «Нарвак» (Россия).

Для **инактивации вакцинного вируса** использовали теотропин по ТУ 931004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, в качестве адъюванта – гидроксал по ГОСТ 18287.

Титрацию вируса парвовирусного энтерита собак проводили в РГА со свиными эритроцитами и с помощью ИФА, титрацию антител к парвовирусу в РТГА с этими же эритроцитами с 4–8 гемагглютинирующими единицами вируса по общепринятым методикам [5].

Определение контаминации вирусных материалов и вакцины бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196–197, 2000–2001. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

Определение безвредности вакцины. Объединенную пробу из двух флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины в объеме 0,5 см^2. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней. Результаты учитывали по отсутствию местных реакций и выживаемости животных.

Определение срока годности вакцины. Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре плюс 10°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение вирусного сырья для изготовления вакцины. Культивирование вируса парвовирусного энтерита собак (ПВЭС) на культуре клеток CRFK со средой Игла проводили в статических условиях в 1,5 литровых матрасах и в 2-литровых роллерах при температуре 37±0,5^{0}С. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Вирус вносили одновременно с клетками. Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. Урожай вируса собирали через 3–4 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость, матрасы и роллеры замораживали при температуре минус 18–20^{0}С в течение 18 и более часов.

Наибольшее накопление вакцинного вируса происходило при роллерном способе культивирования (8,0±0,25 $\log_2$). Существенной разницы в титрах вируса через 3 и 4 суток культивирования не выявлено.

Отработка метода и режима инактивации вируса. Для инактивации вируса

теотропин добавляли до конечной концентрации 0,05; 0,1 и 0,15% и выдерживали в термостате при температуре +37°С, периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность путем заражения культуры клеток CRFK в дозе 4–8 ГАЕ на пробирку. Опыт повторяли в 3 повторностях.

В результате было установлено, что теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре 37°С полностью инактивировал вирус. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титр вируса. В дальнейшей работе для инактивации вируса ПВЭС мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина.

Определение оптимальной концентрации гидроксала для конструирования вакцины. В культуральную жидкость вируса ПВЭС добавляли гидроксал в концентрации 5 и 10об%. Смесь вируса с различной концентрацией гидроксала выдерживали, помешивая в течение 18 часов, в холодильнике при температуре 4°С и центрифугировали при 4000 об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную жидкость вируса ПВЭС титровали в РГА. 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-х повторностях.

В результате установлено, что оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции вируса является 10 об.%. Титр вируса при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 6,0 $\log_2$. В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

Конструирование вакцины и изучение ее стерильности, безвредности и иммуногенности. Вакцина представляет собой жидкость светло-розового цвета со слабой опалесценцией. Для конструирования вакцины в качестве вируссодержащего материала использовали вирус ПВЭС КМИЭВ-14в в титре 7,0–8,0 $\log_2$, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15% концентрации, в качестве адъюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

Способ изготовления вакцины включал репродукцию вируса, его инактивацию и конструирование вакцины.

Вирус ПВЭС репродуцировали на культуре клеток CRFK со средой Игла и 10% сыворотками эмбрионов крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре +37°С. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Урожай вируса собирали через 3–4 суток культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

Вирусное сырье инактивировали теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре +37°С и добавляли гидроксал до конечной концентрации 10 об%. Вакцина была стерильной в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры. При подкожном введении по 0,5 см^3 белым мышам не вызывала их гибели и патологических изменений в месте введения.

Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре 10–18°С.

При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 24 месяцев (срок наблюдения). Однако иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения снижалась. Поэтому в условиях хранения при плюс 10–18°С оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 1).

Таблица 1 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против ПВС в зависимости от срока хранения (n-3)

№ п/п	Показатели	Сроки хранения, месяцев			
		6	12	18	24
1	иммуногенная активность	8,0	8,0	7,0	5,0
2	стерильность	+	+	+	+
3	безвредность	+	+	+	+

Примечание – « + » положительный результат; титры антител к ПВС в log_2

Первоначальные исследования были посвящены определению рациональной иммунизирующей дозы вакцины.

В опыт было взято 4 группы кроликов, по 7 в каждой. Животных 2-х групп иммунизировали инактивированным вирусом с 10% гидроксала. Первой группе животных ввели вирус в объеме 1,0 см^3, второй – в объеме 2,0 см^3. Третью группу кроликов с целью сравнения иммунизировали российской вакциной «Мультикан-8» в дозе по 2,0 см^3. Четвертая группа неиммунизированных кроликов служила контролем.

Вакцины вводили подкожно двукратно с интервалом 21 день. Через 14 и 28 дней после иммунизации от животных были получены пробы крови и определен титр антител против вируса ПВЭС.

В результате у всех животных получен положительный иммунный ответ уже к 14 дню после введения вакцины. Наиболее высокие титры антител имели животные, вакцинированные по 2,0 см^3 сконструированной вакциной против ПВЭС и вакциной «Мультикан-8». К 28 дню после иммунизации вышеуказанные животные имели защитные титры антител 1:256. В местах введения вакцин припухлостей и болезненности в течение всего опыта не отмечалось.

Изучение иммунологической эффективности вакцины против парвовирусного энтерита проведено также в опыте на собаках. Для этого были подобраны серонегативные животные, которых распределили на четыре группы по принципу аналогов, по 6 животных в каждой. Животных первой группы вакцинировали конструируемой вакциной двукратно по 1,0 см^3 с интервалом 21 день. Вакцину вводили внутримышечно с внутренней поверхности бедра.

Животных второй группы иммунизировали по такой же схеме по 2,0 см^3, а животных третьей группы – вакциной Мультикан-8 по 2,0 см^3. Невакцинированные животные четвертой группы служили контролем.

До вакцинации, через 21 день после первого введения вакцины и через 14 дней после второго введения у всех вакцинированных животных были отобраны пробы крови с целью определения титров антител. Титры антител против парвовирусного энтерита определяли в РТГА.

За всеми животными вели наблюдение в течение 21 дня после вакцинации.

В результате у животных, вакцинированных вакциной против ПВЭС, титры антител к парвовирусу на 21-й день после первого введения вакцины и на 14 день после второго введения были относительно высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан-8 (против чумы, парвовируса, аденовируса, коронавируса, лептоспироза и бешенства) (6,0–8,0 log_2). Все животные в течение 21 дня после вакцинации оставались клинически здоровыми, имели хороший аппетит, какие либо местные реакции на месте введения вакцины отсутствовали.

В производственном опыте иммунологическая эффективность экспериментальной серии вакцины проверялась согласно программе, утвержденной начальником Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Минсельхозпрода Республики Беларусь.

В Брестской горветстанции было привито сконструированной вакциной 68 собак разных возрастов и пород, принадлежащих гражданам Бреста. Вакцину вводили подкожно за лопаткой дважды с интервалом 21 день: для собак крупных пород в дозе 2,0 $см^3$, для собак мелких пород – 1,0 $см^3$. Жалобы со стороны владельцев собак, осложнения или заболевания после прививок животных в течение месячного патронажа не отмечены.

ВЫВОДЫ

1 Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против парвовирусного энтерита собак «Парвовак» является безвредным, стерильным и высоко иммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческим вакцинам зарубежного производства.

2 При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно с интервалом 14–21 день в объеме 2,0 $см^3$ через 28–35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры антител 1:128–1:256, чем при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан-8 1:64–1:256.

3 Сконструированная вакцина в качестве вируссодержащего материала включает вирус ПВЭС КМИЭВ-14в в титре 7,0–8,0 log_2, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адъюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

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

Вирус ПВЭС репродуцируют на культуре клеток CRFK со средой Игла и 10% сыворотками эмбрионов крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре 37°С. Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Урожай собирают через 3–4 суток культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

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

5 Хранение при температуре 4–10°С обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

6 На основании проведенных исследований разработаны ТНПА (ТУ, опытно-промышленный регламент, инструкция по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против парвовирусного энтерита собак «Парвовак».

ЛИТЕРАТУРА

1 Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных./ В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина //М., 1998. – 927 с.

2 Шуляк, Б.Ф. Вирусные инфекции собак / Б.Ф. Шуляк //М: ОПИТА.– 2004. – 560 с.

3 Castro, T.X. Canine parvovirus and intestinal parasites Laboratory diagnosis and clinical signs from pappies with gastroenteritis/ T.X Castro, C.M. Uchoa, N.V. Laborthe // Intern J. Apple Res . Vet. Med. Vol. 5.– N2. – 2007.

4 Savigny, M. Canine parvovirus enteritis /M. Savigny, K.M. Douglass // Standards of care .December 2007. – Vol. 9. 11

5 Prittie, J. Canine parvovirus enteritis. A review of diagnosis, management and prevention// Journal of veterinary Emergency and critical care.Vol. 14. Issue 3, September 2004. – P. 167–176

6 Vippan, K. Canine parvovirus enteritis in papp / K. Vippan, P. Heigo, K. Parveen, S. Hanish, V. Mohanwadhavan // Animals of veterinary and animal Science. Aug-Oct. – 2015.