

УДК 619:616.98:578.822.2:636.7

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, академик НАН Беларуси
Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор
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 ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

Резюме

В статье изложены клинико-морфологические проявления, методы диагностики и профилактика чумы собак. Обнародованы результаты о проведенных собственных исследованиях по конструированию и испытанию на иммуногенность инактивированной вакцины против чумы плотоядных.

Summary

In article klinoko-morphological manifestations, methods of diagnostics and prevention of plague of dogs are stated. Results about the conducted own researches on designing and test for an immunogenicity of the inactivated vaccine against plague of the carnivorous are published.

Поступила в редакцию 28.05.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Чума плотоядных – преимущественно остропротекающая болезнь животных отряда хищных, характеризующаяся лихорадкой, катаральным воспалением слизистых оболочек органов дыхания, пищеварения, мочевыведения, кожной экземой и поражением нервной системы.

Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус сем. *Paramixoviridae-Caninae distemper morbillivirus*, впервые открытый французским исследователем Карре [8].

Вирусную природу чумы собак позднее подтвердили русские ученые И.Г.Эйген (1912), М.А. Орлов (1922), Я.Э. Василец (1924) и иностранные Лейдлоу и Денкин (1926) (Черкасский Е.С. Чума и чумоподобные болезни плотоядных.–«Колос».–Москва, 1971.– 199с.).

К инфекции восприимчив широкий спектр животных: собаки, лисицы, волки, шакалы, еноты, куницы, норки, соболи и др.

Заболевание распространено на всех континентах и во всех странах, в том чис-

ле в России и Беларуси, и наносит существенный экономический ущерб пушному звероводству и собаководству. Наиболее восприимчив к заболеванию молодняк в возрасте 2–6 месяцев (период отъема и смены зубов), летальность среди которого может достигать 80–100% [2].

Вирус передается респираторно, алиментарно и половым путем. Воздушно-капельный механизм передачи вируса является преобладающим и во многом обуславливает характер развития эпизоотического процесса при чуме. Резервуаром вируса служат больные или переболевшие животные. Вирус выделяется от больных с истечениями из глаз, носа, а также со слюной, калом, мочой [4].

Заражение чумой плотоядных происходит как при непосредственном контакте здоровых с больными животными, так и через контаминированные вирусом предметы (предметы ухода за животными, одежда обслуживающего персонала, транспортные средства и т. д.). В качестве переносчиков могут быть птицы, крысы, кровососущие насекомые и др. Установлен

вертикальный путь передачи вируса – через плаценту от больной матери потомству.

Возбудитель слабоустойчив к действию плюсовых температур: инактивируется при температуре 56⁰С в течение 30 минут, при температуре 100⁰С – мгновенно. Чувствителен к действию дезинфицирующих веществ, ультрафиолетовых и гамма-лучей, инактивируется видимым светом. Во внешней среде в выделениях от больных животных (кал, слизь) вирус сохраняется до 7–11 дней, при температуре 4⁰С в крови – до 14 дней, в замороженных органах от павших животных при температуре минус 20⁰С – до 6 месяцев [7].

Вирус размножается в первичных и перевиваемых культурах клеток из органов и тканей восприимчивых животных, крупного рогатого скота, овец, обезьян, человека, а также в куриных и утиных эмбрионах с образованием цитопатогенного эффекта – ЦПЭ [1, 5].

Одной из основных мер профилактики и борьбы с чумой плотоядных является вакцинопрофилактика [3]. В настоящее время разработан и применяется ряд инактивированных и живых вакцин против указанного заболевания. Это моновакцины (Вакчум, вакцины из штамма ЭПМ, Мультикан-1 и др.), ассоциированные вакцины Биовак, Владивак, Гексаканивак, Дипентавак, Мультикан-4, 5, 6, 7, Бивировакс, Вакцидог-комби, Вангард-5, 7; Гексадог, Нобивак ДНРРi и др. [6].

Все указанные вакцины зарубежного производства. В Беларуси вакцины против чумы плотоядных не производятся. Их приходится закупать в других странах, на что требуются затраты валютных средств и что значительно удорожает проведение профилактических мероприятий, особенно если учесть, что в Беларуси ежегодно прививается против чумы плотоядных около 2-х млн. пушных зверей и собак.

Поэтому разработка и налаживание производства отечественной вакцины против чумы плотоядных является важной

практической задачей.

Наши исследования были посвящены конструированию жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против чумы плотоядных 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.

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 работе использовали вирус чумы плотоядных, штамм КМИЭВ-82, который селекционирован из выделенного от собак эпизоотического штамма и адаптирован к культурам клеток *Vero*. Указанную культуру клеток использовали и для накопления вирусного сырья при производстве вакцины.

Выявление и титрование вируса чумы плотоядных и антител к нему проводили на культуре клеток *Vero* по общепринятым методикам.

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

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 по 0,5 см³. 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 4–10°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Получение вирусного сырья для изготовления вакцины. Культивирование вируса чумы плотоядных на культуре клеток *Vero* со средой Игла проводили в статических условиях в 1,5 литровых матрасах и в 2-литровых роллерах при 37±0,5°C. Заражающая доза вируса составляла 0,1 ТЦД /кл. Вирус вносили одновременно с клетками. 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 температуре минус 18–20°C в течение 18 и более часов.

Наибольшее накопление вакцинного вируса происходило при роллерном способе культивирования (4,5±0,2 ТЦД_{50/см³}). Существенной разницы в титрах вируса через 3 и 4 суток культивирования не выявлено.

2 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°C, периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность путем заражения культуры клеток в дозе 0,6ТКИД_{50/кл} на пробирку. Опыт проводили в 3 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.

В дальнейшей работе для инактивации вируса ПВЭС мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина.

3 Определение оптимальной концентрации гидроксала для конструирования вакцины. В культуральную жидкость вируса чумы плотоядных добавляли гидроксал в концентрации 5 и 10%. Смесь вируса 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 в культуре клеток *Vero*. 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 1,0 lg.

В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

4 Конструирование вакцины и изучение ее стерильности, безвредности и иммуногенности. Вакцина представляет собой жидкость светло-розового цвета со слабой опалесценцией. Для конструирования вакцины в качестве вирусосодержащего материала использовали вирус чумы плотоядных КМИЭВ-82 в титре $4,5\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, выращенный в культуре клеток *Vero*, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

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

Вирус чумы плотоядных репродуцировали на культуре клеток *Vero* со средой Игла и 10% сыворотки крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре 37°C. Заражающая доза вируса составляла $0,01\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$. Урожай 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°C и добавляли гидроксал до конечной концентрации 10 об%. Вакцина была стерильной в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры. При подкожном введении по $0,5\text{ см}^3$ белым мышам не вызывала их гибели и патологических изменений в месте введения.

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 температуре плюс 4–10°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления.

Первоначальные исследования по изучению иммунологической эффективности вакцины были посвящены определению

ее рациональной иммунизирующей дозы.

В опыт было взято 4 группы кроликов по 10 в каждой. Животных 2-х групп иммунизировали сконструированной вакциной. Первой группе животных ввели вакцину в объеме $1,0\text{ см}^3$, второй – в объеме $2,0\text{ см}^3$. Третью группу кроликов с целью сравнения иммунизировали российской вакциной «Мультикан-8» (против чумы, аденовирусных инфекций, парво- и короновирального энтеритов, лептоспироза и бешенства) в дозе по $2,0\text{ см}^3$. Четвертая группа неиммунизированных кроликов служила контролем.

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

В результате у всех животных получен положительный иммунный ответ уже к 14 дню после введения вакцины. Наиболее высокие титры противочумных антител имели животные, вакцинированные по $2,0\text{ см}^3$ сконструированной вакциной и вакциной «Мультикан-8». К 28 дню после иммунизации вышеуказанные животные имели защитные титры антител $5,0\pm 1,0$ – $6,0\pm 1,0\log_2$. В местах введения вакцин припухлостей и болезненности в течение всего опыта не отмечалось.

Изучение иммунологической эффективности вакцины против чумы плотоядных 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 сконструированной вакциной двукратно по $1,0\text{ см}^3$ с интервалом 21 день. Животных второй группы иммунизировали по такой же схеме сконструированной вакциной по $2,0\text{ см}^3$, а животных третьей группы – вакциной Мультикан-8 по $2,0\text{ см}^3$. Вакцину вводили внутримышечно во внутреннюю поверхность бедра. Невакцинированные животные четвертой группы служили контро-

лем.

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

В результате у животных, вакцинированных сконструированной вакциной, титры антител к вирусу чумы плотоядных на 21 день после первого введения вакцины и на 14 день после второго были относительно высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан-8 (5,0–6,0 log₂). Все животные в течение 21 дня после вакцинации оставались клинически здоровыми, имели хороший аппетит, какие-либо местные реакции на месте введения вакцины отсутствовали.

Производственные испытания вакцины с положительным результатом проведены в райветстанциях Воложинского и Молодечненского районов Минской области, неблагополучных по чуме плотоядных.

В Молодечненской и Воложинской райветстанциях сконструированной вакциной привито 2200 собак разных пород и возрастов, принадлежащих гражданам г. Молодечно и Воложина.

Вакцина вводилась внутримышечно в области бедра или подкожно в области шеи в дозе 2 см³ двукратно с интервалом 20–21 день. За привитыми животными в течение месяца было установлено патронажное наблюдение.

За это время случаев падежа, каких-либо осложнений или местных реакций, потери аппетита ни у одного животного не зарегистрировано. Экономическая эффективность от применения предложенной вакцины составила 6 млн. рублей на 1000 привитых животных.

ВЫВОДЫ

1 Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против

чумы плотоядных является безвредным, стерильным и высоко иммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства.

2 При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно с интервалом 21 день в объеме 2,0 см³ через 28–35 дней от начала иммунизации они имели такие же высокие титры антител, как при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан-8 (5,0–6,0 log₂).

3 Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает вирус чумы плотоядных КМИЭВ-82 в титре 4,5ТЦД₅₀/см³, выращенный в культуре клеток *Vero*, в качестве инактиватора вируса – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

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

Вирус чумы плотоядных репродуцируют на культуре клеток *Vero* со средой Игла и 10% сыворотками крупного рогатого скота в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых роллерных флаконах при температуре 37°C. Заражающая доза вируса составляла 0,1ТЦД₅₀/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°C и добавляют гидроксал до конечной концентрации 10 об%.

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

6 На основании проведенных исследований разработан ТНПА (ТУ, экспериментально-заводской регламент, инструкция по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против чумы плотоядных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Rzezutka, A., Mizak, B. Comparative studies of sensitivity of digoxigenin –labelled probes and detection systems confirming replication of CDV VERO cells Bull Vet. Inst. Pulawy 47, 2003. – P.3–8.
- 2 Carter, G.R.; Flores, E.F.; Wise, D.J. (2006). «Paramyxoviridae». A Concise Review of Veterinary Virology. Retrieved 2006–06–24.
- 3 Canine Distemper (CDV)". UC Davis Koret Shelter Medicine Program. 2004. Retrieved 2013–08–17. Am J Vet Res. 1997 Aug;58(8):833–6.
- 4 Hirsch, D.C.; Zee, C.; Others, (1999). Veterinary Microbiology. Blackwell Publishing.
- 5 Nishi, T.; Tsukiyama-Kohara, K.; Togashi, K.; Kohriyama, N.; Kai, C. (2004). «Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus». Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 27 (6): 445–55. doi:10.1016/j.cimid.2004.01.007.
- 6 Pardo, M.C.I., Bauman, J.E., Mackowiak, M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. Am J Vet Res. 1997 Aug;58(8):833–6.
- 7 Pefrson, R.C. and Gorham, J.R. Canine distemper virus. Virus infection of carnivores. J virus infections of vertebrates, vol. 1.–1987.– p. 371.
- 8 Pomeroy, Laura W., Bjørnstad, Ottar N., Holmes, Edward C. (2008). «The Evolutionary and Epidemiological Dynamics of the Paramyxoviridae». Journal of Molecular Evolution 66 (2): P.98–106.

УДК 619:615.4:636.4

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор*
Дубинич В.Н., заместитель декана факультета ветеринарной медицины**

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

**УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «БИТОКС» НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ ОРГАНИЗМА СВИНЕЙ

Резюме

В статье приведены результаты влияния комплексного препарата для лечения и профилактики микотоксикозов животных «Биотокс» на обменные процессы организма свиней в условиях свинокомплекса «Желудокский». Установлено, что применение комплексного препарата «Биотокс» позволяет нормализовать состояние животных, снизить интенсивность воздействия на печень токсичных компонентов корма, что видно по снижению уровня печёночных ферментов АсАТ и АлАТ, билирубина. Влияние на биологическую реактивность и резистентность организма можно видеть по уровню белкового обмена и тех изменений, которые произошли при применении препарата.

Summary

The results of the influence of complex preparation for the treatment and prevention of mycotoxin animals «Biotoks» on the metabolic processes of the body of pigs in a pig «Zheludoksky». It was found that the use of complex preparation «Biotoks» for the treatment and prevention of mycotoxin farm animals helps to normalize the animals, to reduce the intensity of the effects on the liver of toxic components of food that can be seen to reduce the level of liver enzymes AST and ALT, bilirubin. The impact on general biological reactivity and resistance of the body can indirectly judge by the level of protein metabolism and the changes that have occurred in the application of the drug in animals.

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкая распространённость микотоксинов в кормах приводит к снижению естественной резистентности и реактивно-

сти организма, повышению восприимчивости животных к действию отрицательных факторов окружающей среды, что неизбежно ведёт к снижению продуктивности,