

УДК 619:615.371:578.824.1:639.11

**РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ
ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ИЗ ШТАММА ВИРУСА
КМИЭВ-94**

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

Д.В. Бучукури, кандидат ветеринарных наук

П.А. Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор

А.А. Гусев, член-корр. РАСХН, доктор ветеринарных наук, профессор

М.М. Усеня, научный сотрудник

Т.А. Савельева, кандидат ветеринарных наук, доцент

В.А. Бабак, аспирант

Т.Н. Буркун, научный сотрудник

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

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что бешенство уже достаточно долго находится под пристальным вниманием биологической науки, ветеринарной и санитарно-эпидемиологической служб и за последние десятилетия отмечены значительные достижения в изучении его природы, усовершенствовании диагностики и профилактики, в плане ликвидации оно по-прежнему представляет серьезную проблему. По степени распространения, тяжести проявления, социально-экономической значимости заболевание занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии животных и человека. По данным экспертов ВОЗ и МЭБ, ежегодно в мире от бешенства погибает свыше 30 тыс. человек и более 1 млн. животных. Бешенство широко распространено и в Республике Беларусь. Напряженность эпизоотической ситуации в республике усугубляется широким распространением бешенства диких плотоядных в сопредельных государствах. По данным МЭБ, в 2004 г. зарегистрировано случаев бешенства: в Польше – 136, Литве – 553, Латвии – 443, Эстонии – 314, европейской части России – 1549.

В Республике Беларусь в 1996 г. было выявлено 16 случаев заболевания, в 1999 г. диагноз подтвержден в 130 случаях, в 2000 г. – в 358, 2001 г. – 504, 2002 г. – 832, 2003 г. – в 1143 случаях. В 2004 г. ситуация несколько улучшилась (226 случаев), но в 2005-2007гг. снова наметилась тенденция роста – за 2005 г. бешенство выявлено у 626, в 2006 г. – 1614 животных и за 2007 г. – у 898 животных.

Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей. Обращаемость населения в связи с укусами, оцарапыванием

и ослужением животными возросла до 28000 случаев в год. В 2000-2006гг. отмечено 6 случаев гибели от бешенства людей [1].

Резервуаром и главным источником вируса бешенства в Беларуси являются дикие плотоядные, в первую очередь лисицы и енотовидные собаки, на долю которых приходится свыше 70% случаев заболевания. Являясь основным вектором распространения бешенства, они непосредственно или через собак и кошек заражают бешенством домашних продуктивных животных и человека. Следовательно, наиболее эффективным способом борьбы с бешенством является ликвидация очагов инфекции в популяциях лисиц и других плотоядных. Для этого осуществяемые меры борьбы с бешенством должны быть направлены на снижение плотности популяции данного вида животных. Комитет экспертов ВОЗ (1981) считает, что для предупреждения эпизоотии бешенства плотность лисиц не должна превышать две особи на 10 км².

Однако проводимые мероприятия, направленные на снижение численности лисиц, такие как отстрел, газация нор, отравление приманками, гормональная стерилизация и другие являются полеативными. Они дают лишь временный эффект и не решают проблему, о чем свидетельствует опыт ряда Европейских стран. Кроме того, эти мероприятия могут нарушать экологическое равновесие в природе и приводят к отрицательным последствиям.

По этому в основу профилактики бешенства диких плотоядных в настоящее время положена, наряду со снижением их численности, пероральная вакцинация, которая технически осуществима в природных условиях.

Для изготовления антирабических вакцин ВОЗ рекомендует следующие штаммы вируса бешенства: Парижский штамм Пастера, PV-11 или PM, Flury Lep, Flury Her, Kelev, ERA и Внуково-32.

Парижский штамм Пастера – первый вакцинный штамм вируса бешенства. Он выделен в 1882 г. из мозга погибшей от бешенства коровы. В результате 50-ти мозговых пассажей на кроликах вирус приобрел свойства фиксированного. Внутримозговой 90-ый пассаж на кроликах был использован Пастером для изготовления первой антирабической вакцины. В дальнейшем Парижский штамм распространился по всему миру и используется (под разными названиями) до настоящего времени для изготовления антирабических вакцин. В России (прошедший более 34500 внутримозговых пассажей на кроликах) он используется под названием «Москва», штамм «Овечий».

Штамм PV-11 или PM, является производным пастеровского штамма фиксированного бешенства.

Штамм Flury Lep выделен в США из мозга погибшей девочки по имени Флори, прошел 130 пассажей через мозг однодневных цыплят и 40-50 пассажей в развивающихся куриных эмбрионах. На этом уровне

пассажей он апатогенен для собак и кроликов при подкожном введении, слабо патогенен для мышей, морских свинок и сирийских хомячков при подкожном и внутримышечном введении. Штамм высокопатогенен для всех лабораторных животных при внутримозговом заражении.

Штамм Flury Her – это штамм Flury Lep прошедший 180 пассажей на куриных эмбрионах. На этом уровне пассажей он утратил патогенность для мышей при внутримозговом заражении, но сохранил ее для мышей-сосунов 3-8-дневного возраста. При внутримышечном и подкожном введении он апатогенен для всех лабораторных животных, в том числе и для щенят до 3-х месячного возраста.

Штамм Kelev выделен из мозга бешеной собаки. После четырех пассажей через мозг мыши прошел более 100 пассажей на куриных эмбрионах. На уровне 70-го пассажа штамм почти полностью утратил патогенность для взрослых кроликов, мышей, хомяков и собак при введении внутримышечно или в мозг, сохранив при этом патогенность для мышей 10-14-дневного возраста.

Штамм EPA является вариантом штамма SAD (Street Alabama Dufferin), который был выделен от бешеной собаки в штате Алабама (США). Штамм прошел 130 пассажей через мозг мышей, затем был адаптирован к культуре клеток почки сирийского хомяка. После 30-ти пассажей в этой системе вирус прошел восемь пассажей на куриных эмбрионах и затем адаптирован к культуре клеток почки поросенка. Вирус 35-го пассажа в культуре клеток почки поросенка получил название EPA.

Путем более 90 пассажей вируса штамма EPA на клеточной линии почки взрослой свиньи (PK₂A) получен новый штамм, названный PR1, высокоиммуногенный и непатогенный для собак, кошек, лошадей, свиней, который предложен в качестве живой антирабической вакцины.

Штамм Внуково-32 представляет собой вариант штамма SAD, прошедший 90-100 пассажей при +32°C в культуре клеток почки сирийского хомяка.

Кроме перечисленных для изготовления антирабических вакцин для животных используются и другие штаммы вируса. Так, в странах СНГ для этих целей используют штаммы Щелково-51, ТС-80, 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ, РВ-97, КМИЭВ-94.

Штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ, получен из штамма «Овечий» ВГНКИ. Он прошел 23 чередующихся пассажа в организме белых мышей и культурах клеток ПСХ, 33 прямых пассажа в культуре клеток ПСХ, два в КПЭ, три перемежающихся пассажа в организме овец и ПК, пять последовательных пассажа в культуре клеток ПК.

Штамм ТС-80 получен путем аттенуации вируса, выделенного от летучей мыши.

Штаммы Щелково-51 и РВ-97 являются вариантами штамма «Овечий» ВГНКИ [2].

Для пероральной антирабической вакцинации в настоящее время используются следующие вакцины:

- вакцина из штамма Внуково-32, выращенного в культуре клеток ВНК-21 с использованием питательной среды Игла [2];
- вакцина из штамма вируса бешенства Вегн-19, выращенного в перевиваемой культуре клеток ВНК-21, клон.13 на среде Игла [2];
- вакцина из штамма вируса бешенства ТС-80, выращенного в суспензии клеток ПС или ВНК-21 с использованием питательной среды Игла-МЕМ [2];
- вакцина из штамма РВ-97, выращенного в суспензии клеток ВНК-21 [2].

Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н. Вышелесского предложил в 80-х годах 20-го столетия для пероральной вакцинации диких плотоядных животных против бешенства вакцину из штамма 71-БелНИИЭВ-ВГНКИ [2]. Вакцина готовилась в институте и в практических условиях, показала удовлетворительную эффективность. Однако готовилась она в ограниченных количествах и поэтому значительную часть вакцины республика вынуждена была приобретать по импорту. В 2007 г. производство пероральной антирабической вакцины по лицензии Чехии начато осваиваться на Витебской биофабрике.

Вирус, использовавшийся для приготовления вакцины в НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского, накапливался в культуре клеток ФЭК в относительно низком титре, что вынуждало применять ее в сравнительно больших дозах (5 см³ на приманку) и значительно удорожало стоимость вакцинации. Поэтому конструирование новой высокоиммуногенной, технологически экономичной вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства и отработка рациональной технологии ее приготовления являлось актуальной задачей.

Цель настоящей работы: сконструировать эффективную вакцину для пероральной иммунизации диких плотоядных против бешенства на основе нового модифицированного высокоиммуногенного штамма вируса бешенства, разработать рациональную технологию ее производства и внедрить в практику.

Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Селеционировать высокоиммуногенный штамм вируса бешенства.
2. Изыскать рациональный способ получения вирусного сырья для изготовления вакцины.
3. Изготовить вакцину антирабическую жидкую культуральную для пероральной иммунизации диких плотоядных животных и изучить эффективность вакцины в комиссионном и производственном опытах на животных.

4. Изучить срок годности вакцины.
5. Разработать проект ТНПА на вакцину (ТУ, инструкцию по изготовлению и контролю, инструкцию по применению).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в отделах профилактики бешенства, культур клеток и виварии РУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского», а также виварии ГУО «Белорусский государственный медицинский университет».

Исследования проводили на белых мышах, кроликах и собаках. Нелинейных белых мышей получали из питомника ГУО «Белорусский государственный медицинский университет» и, частично, из питомника РУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского». Для опытов брали мышей массой 18-20 г, для титрации вируса – массой 6-8 г. Кроликов породы Шиншилла, преимущественно самцов, массой 2-3 кг и собак различных пород массой 8-15 кг получали из вышеуказанных питомников.

Фиксированный вирус бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ был селекционирован в Белорусском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии Ковалевым Н.А. и др. из штамма «Овечий» ВГНКИ 80-го пассажа в мозге овец и адаптирован к культуре клеток почки кролика и культуре клеток куриных фибробластов (Авторское свидетельство № 1091393 от 08.01.1984 г.). В лаборатории института вирус поддерживается на культуре клеток РЭК.

Фиксированный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 был селекционирован в «РНИУП Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии НАН Беларуси» из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и адаптирован к культуре клеток Vero, ПС, ВНК-21.

Фиксированный вирус бешенства штамм CVS в виде мозговой культуры получен в 1971 г. из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. В БелНИИЭВ вирус адаптирован к культуре клеток РЭК.

При изучении иммуногенной активности вакцины из селекционированного вируса бешенства КМИЭВ-94 с целью контроля животных прививали культуральной антирабической вакциной из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ. Культуральная антирабическая вакцина из штамма Щелково-51 производства Щелковского биокомбината служила в качестве референс-вакцины при испытании иммуногенности сконструированной вакцины по методу НИН (ВОЗ, Женева, 1975) [3].

Для диагностических исследований мозга подопытных животных применяли флуоресцирующий антирабический гамма-глобулин производства Всероссийского ветеринарного НИИ (г. Казань) и фирмы «BioRad» (США).

Для культивирования вирусов бешенства использовали перевиваемые культуры клеток VERO, ПС, ВНК-21, а также первичную культуру

ру ФЭК. В качестве питательной среды применяли среду Игла с глютамином. Культивирование клеток проводили по общепринятой методике при $(+37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в статических условиях в матрасах (1,5 л) или флаконах (0,5 л) на роллерной установке.

Титрацию вируса проводили частично в культуре клеток, частично на белых мышах.

На культуре клеток титрацию вируса проводили в полистироловых планшетах фирмы FALCOM с 96-ю лунками и плоским дном в инкубаторе с атмосферой CO_2 и увлажнением при температуре $(+37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. С этой целью за 10 мин до постановки реакции во взвесь клеток в культуральной среде в концентрации 5×10^5 - 6×10^5 клеток/мл вносили ДЕАЕ-декстран в разведении 1% окончательного объема при медленном помешивании.

Десятикратные разведения вируса для титрации делали на питательной среде в пробирках от 10^{-1} до 10^{-8} . Из приготовленных разведений вируса сверху вниз, начиная с наивысшего разведения, микропипеткой вносили в лунки микропланшет вирусосодержащую суспензию в объеме по 100 мкл на лунку. На каждое разведение использовали ряд не менее четырех лунок. После того, как разведения вируса были перенесены в лунки микропланшет, туда же вносили с помощью многоканальной пилетки суспензию клеток в объеме 50 мкл на лунку. Планшеты слегка встряхивали с целью равномерного распределения клеток в лунках. Реакцию сопровождали контроли: питательная среда плюс культура клеток; одна питательная среда; питательная среда, нативный вирус и культура клеток. После этого планшеты помещали на 24 ч в инкубатор с атмосферой 5% CO_2 и увлажнением.

По окончании инкубации проводили фиксацию и окраску клеток. Предварительно проводили световую микроскопию с целью контроля за состоянием монослоя клеток на дне лунок. Из всех лунок удаляли надосадок в сосуд с дезраствором и дважды промывали лунки фосфатно-буферным раствором, охлажденным до температуры $+4^{\circ}\text{C}$ и один раз 80%-ным водным раствором ацетона. Затем все лунки микропланшет заполняли 80%-ным раствором ацетона и помещали в морозильник на 30 мин при температуре – минус 20°C . После этого лунки освобождали от ацетона, а планшеты просушивали. В каждую лунку добавляли по 50 мкл диагностического антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина в рабочем разведении и выдерживали в течение 30 мин в термостате при $(+37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. Конъюгат удаляли, планшеты промывали дважды фосфатно-буферным раствором (1-я водяная баня – одна минута, вторая – пять минут). Раствор удаляли, планшеты просушивали.

Учет реакции осуществлялся с помощью люминесцентного микроскопа. Реакция считалась положительной, если в лунке обнаруживали

хотя бы одну флуоресцирующую клетку. Расчет титра проводили по методу Кербера. Титр выражался в Ig.

Титрование вируса бешенства на белых мышах проводили общепринятым методом (ВОЗ, Женева, 1975) [3].

Определение контаминации бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196-197, 200-20. На питательных средах с посевами вакцины допускали рост до 30 колоний бактерий и до 30 колоний грибов на одну дозу.

Иммуногенную активность вакцины проверяли объемным методом Национальных Институтов Здравоохранения США (НИН). По этому методу сравнивают 50% конечное разведение (Kp) испытуемой вакцины с 50% Kp Международной эталонной вакцины (или эквивалентной национальной референс-вакцины). Из вакцины делали три последовательных разведения с пятикратным шагом, начиная с 1:25 (1:25, 1:125, 1:625). Каждое разведение делали отдельной пипеткой с обязательным предварительным встряхиванием препарата.

Каждым разведением референс-вакцины и испытуемой вакцины иммунизировали не менее 12 белых мышей. Вакцину вводили внутрибрюшинно в объеме 0.5 см³ двукратно с недельным интервалом. 40 мышей из этой группы сохраняли для титрования тест-штамма.

Через 14 суток вакцинированным мышам вводили интрацеребрально в объеме 0,03 см³ разрешающую дозу тест-штамма CVS, составляющую по предварительному титрованию 5-50 ЛД₅₀.

Одновременно на 40 контрольных мышах проводили титрование вируса для определения истинного количества доз вируса, взятого для заражения. Для этого из основного разведения вируса CVS (используемого для заражения вакцинированных мышей) делали три последовательных десятикратных разведения (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³). Вирус вводили интрацеребрально в объеме 0,03 см³. Одной группе (10 голов) – разрешающую дозу, группам 2, 3 и 4 (по 10 голов в каждой) – разведения 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³. На основании полученных результатов рассчитывали истинную дозу вируса, взятого для заражения. Наблюдения за животными вели в течение 14 суток.

Kp₅₀-референс-вакцины и Kp₅₀-испытуемой вакцины рассчитывали по формуле 1.

$$X = A + \frac{50 - n}{q - n} x Y \quad (1)$$

где X – lg Kp₅₀;

A – lg обратной величины исходного разведения;

n – показатель смертности ниже 50%;

q – показатель смертности выше 50%;

y – lg кратности разведения;

Kp₅₀ равен антилогарифму полученной величины.

Активность испытуемой вакцины определяли в МЕ (международных единицах) относительно активности референс-вакцины по формуле 2.

$$X = \frac{A}{B} \times Y \quad (2)$$

где X – активность испытуемой вакцины в МЕ;
 A – lg Kp₅₀ испытуемой вакцин;
 B – lg Kp₅₀ референс-вакцины (в опыте);
 Y – количество МЕ в основном разведении национальной референс-вакцины (указано на этикетке).

Иммуногенную активность выражали в международных единицах (МЕ).

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием методов И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева. Во всех опытах различия в результатах были достоверными при уровне значимости P<0,05 и 0,1.

Иммуногенную активность вакцины также оценивали по уровню вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных животных в реакции нейтрализации на белых мышах или методом RFFIT.

С этой целью 10 серонегативным собакам после суточного голодания скормлено по 2 см³ вакцины в вакциносодержащей приманке, 10 – по 4 см³ в 2 приманках (куриные головы). Три невакцинированные собаки служили контролем. В течение 29 суток за животными проводили клиническое наблюдение. Спустя 29 суток от всех подопытных и контрольных животных получены сыворотки крови и определены у них титры специфических антител.

При описании использованных методик мы детально описали лишь те, которые ограниченно применяются в научно-исследовательской работе. Общепринятые методические приемы (работа с культурой клеток, вакцинация, заражение и вскрытие животных, отбор материалов, бактериологические исследования и т. д.) нами не приводятся.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Селекционирование модифицированного вакцинного штамма вируса бешенства и изучение его биологических свойств

Культуру клеток Vero в концентрации 0,05-0,06 млн. кл/мл на среде Игла МЕМ с 10% сыворотки крупного рогатого скота в объеме 180-200 см³ вносили в матрасы (1,5 л), которые помещали в термостат при +37±0,5 °С. На ранней стадии фазы логарифмического роста (18-24 ч) культуру заражали вирусом бешенства 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ в дозе

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

0,1-0,2 LD₅₀/кл, выращенным на ФЭК. Сбор урожая проводили через бсуюток.

На клетках VERO проведено семь последовательных пассажей вируса, а затем 10 чередующихся пассажей через мозг белых мышей и культуру клеток Vero.

Полученный модифицированный вирус в течение пяти пассажей культивировали статичным способом на культуре клеток Vero, ПС и ВНК-21. В качестве контроля на этих же культурах клеток одновременно культивировали вирус штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ. Перед началом культивирования и после трех и пяти пассажей определяли титр вируса на белых мышцах.

Результаты титрования приведены в таблице 1. Как видно из таблицы, на всех использованных культурах клеток титр модифицированного вируса был на 1,1-2,0 lg LD₅₀/мл выше, чем титр вируса штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ. Наиболее высокое накопление модифицированного штамма вируса происходило на культуре клеток ПС (7,0-7,1 lg LD₅₀/мл), на втором месте стояли клетки Vero (6,6-6,9 lg LD₅₀/мл) и на третьем клетки ВНК-21 (6,1-6,4 lg LD₅₀/мл).

Таблица 1 – Накопление исходного 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и модифицированного вируса бешенства при статичном пассировании на различных культурах клеток

Наименование культуры клеток	Титр вируса (lg LD ₅₀ /мл) после пассажей		
	0 (исходный)	3	5
Vero	5,3/6,6	5,2/6,8	5,0/6,9
ПС	5,3/7,0	5,1/7,1	5,4/7,1
ВНК-21	5,3/6,1	5,2/6,3	5,0/6,1

Примечания

1 Значение титра вируса штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ отображено в числителе

2 Значение титра модифицированного вируса отображено в знаменателе

Титры вируса штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ на всех культурах клеток существенно не отличались (5,0-5,4 lg LD₅₀/мл).

С целью проверки безвредности полученного модифицированного вируса он вводился подкожно 10 белым мышам в дозе 0,01 см³ и пяти кроликам в дозе 1,0 см³, а также перорально 10 белым мышам в дозе 0,2 см³, пяти кроликам в дозе 20,0 см³ и пяти собакам в дозе 30,0 см³. Наблюдение за животными продолжали в течение 21 сутки. В результате ни одного случая падежа животных или каких-либо отклонений в поведении не установлено, что свидетельствует о безвредности модифицированного вируса бешенства.

Реверсибельные свойства модифицированного вируса бешенства изучали путем пятикратных последовательных пассажей его через мозг 10 белых мышей и последующего введения такому же количеству животных подкожно в дозе 0,01 и 0,02 см³. Заболевания животных ни в одном случае не выявлено. Это свидетельствует об отсутствии реверсибельности у модифицированного вируса бешенства.

Полученную модификацию фиксированного вируса бешенства штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ мы назвали фиксированный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94. На указанный штамм вируса оформлена патентная заявка и он депонирован в музее культур института под номером КМИЭВ-94.

Изыскание рационального способа культивирования модифицированного вируса бешенства КМИЭВ-94 с целью промышленного изготовления вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных.

Репродукцию вируса проводили в течение четырех последовательных пассажей на перевиваемых культурах клеток ПС, Vero и ВНК-21. Вирус в количестве 0,1-0,2 МИД₅₀/кл вносили в питательную среду Игла с клетками в концентрации 0,5-1,5 млн. кл/мл или на сформировавшийся монослой. Культивирование проводили в статичных условиях или на роллерной установке при (+37±0,5) °С в течение шести суток. Сбор вирусосодержащей жидкости проводили на четвертые и шестые сутки. После каждого пассажа вирус титровали на белых мышах или на культуре клеток в полистироловых планшетах.

В результате установлено, что наиболее высокое накопление вируса происходило на культурах клеток ПС (7,7±0,2 lg ЛД₅₀/мл) и Vero (7,0±0,2 lg ЛД₅₀/мл). На клетках ВНК-21 вирус накапливался в более низких титрах (6,5±0,2 lg ЛД₅₀/мл). Указанные титры вируса получены при роллерном способе культивирования клеток.

При культивировании вируса в культурах клеток в статических условиях титры были на 0,2-0,3 lg ЛД₅₀/мл ниже. Существенных различий в титрах вируса в вирусосодержащей жидкости первого (через 4 суток) и второго (через 6 суток) сливов не установлено (таблица 2).

Таблица 2 – Накопление модифицированного вакцинного вируса бешенства в различных культурах клеток при различных способах культивирования

Наименование культуры клеток	Титр вируса (lg ЛД ₅₀ /мл при культивировании)	
	в статических условиях	роллерным способом
ПС	7,5±0,25	7,7±0,2
Vero	6,8±0,2	7,0±0,2
ВНК-21	6,2±0,1	6,5±0,2

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Изготовление экспериментальной серии вакцины

Экспериментальная серия вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства готовилась роллерным способом на клетках Vero, ВНК-21 или ПС по общепринятой методике. Всего изготовлено 2000 см³ вакцины.

Изготовленная экспериментальная серия вакцины при лабораторном и комиссионном испытании имела следующие показатели.

1. **Стерильность.**
На питательных средах с посевами и пересевами вакцины рост микроорганизмов в течение срока наблюдения отсутствовал.
2. **Инфекционный титр вируса в вакцине составил 6,5 lg LD₅₀/мл.**
3. **Поедаемость** вакциносодержащих приманок. Из 10 собак первой группы, получивших по одной приманке (2 см³ вакцины) и из 10 собак второй группы, получивших по две приманки (4 см³ вакцины), поедаемость животными составила 100% (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты комиссионного испытания поедаемости, безвредности и иммуногенности экспериментальной серии вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства из вакцинного штамма КМИЭВ-94 в опыте на собаках

Номер животного в опыте	Доза вакцины (см ³)	Результат исследования			
		поедаемость	безвредность	титр антител (lg) в дни	
				0	29
1	2	3	4	5	6
1 группа					
51	2	+	безвредна	0	1,92
52	2	+	безвредна	-«-	2,04
53	2	+	безвредна	-«-	2,4
54	2	+	безвредна	-«-	1,94
55	2	+	безвредна	-«-	2,04
56	2	+	безвредна	0	2,04
57	2	+	безвредна	-«-	1,94
58	2	+	безвредна	-«-	2,16
59	2	+	безвредна	-«-	1,94
60	2	+	безвредна	-«-	2,04
2 группа					
61	4	+	безвредна	0	2,28
62	4	+	безвредна	-«-	2,04
63	4	+	безвредна	-«-	2,4
64	4	+	безвредна	-«-	2,16
65	4	+	безвредна	-«-	2,28
66	4	+	безвредна	-«-	2,4
67	4	+	безвредна	-«-	2,28
68	4	+	безвредна	-«-	2,04
69	4	+	безвредна	-«-	2,52
70	4	+	безвредна	-«-	2,28

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
3 группа (контроль)					
71	-	-		0	0
72	-	-		««»	««»
73	-	-		««»	««»

Примечание – приманка с вакциной съедена (+)

4. Безвредность вакцины для плотоядных животных. Все собаки, получившие по одной и две вакциносодержащих приманки, и контрольные собаки в течение 29 суток оставались клинически здоровыми без нарушения аппетита и повышения температуры.
5. Иммуногенность вакцины для плотоядных животных. У всех 10-ти собак первой группы, съевших по одной приманке (2 см³ вакцины) и у 10 второй группы, съевших по две (4 см³ вакцины), выявлена положительная сероконверсия. Титры антирабических антител при исследовании по методу RFFIT на 29 сутки после поедания приманок увеличились с 0,0 lg до 1,8- 2,40 lg.

Существенной разницы в титрах антител у животных первой и второй групп не отмечено (таблица 3). Следовательно, оптимальной дозой вакцины для плотоядных животных следует считать 2 см³. Антитела в таких титрах, по данным литературы, защищают животных от заражения уличным вирусом бешенства (Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усень М.М., 2005).

Производственные испытания вакцины в природных условиях проведены на территории Воложинского района Минской области. Указанный район является стационарно неблагополучным по бешенству. Так, в 2005 г. на территории района зарегистрировано 14 случаев бешенства и за 9 мес. 2006 г. 25 случаев, из них 20 случаев среди лисиц. Площадь района 1,9 тыс. км². Для проведения пероральной вакцинации в районе использовано 19500 вакциносодержащих приманок.

Испытания начаты в 1 квартале 2007 г. Результаты учитывались по эпизоотологическим показателям.

Для практического использования в природных условиях вакцина вводилась в объеме 2 см³ в приманки, в качестве которых служили куриные головы. Туда же вводили в качестве биологического маркера поедаемости по 150 мг тетрациклина гидрохлорида. Хранились и распределялись в неблагополучных или угрожаемых местностях вакциносодержащие приманки в замороженном состоянии.

Кроме Воложинского района вакцина для пероральной вакцинации диких плотоядных животных применена в 16 лесхозах республики. Всего распространено 235820 доз вакцины (таблица 4).

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Таблица 4 – Использование антирабических вакциносодержащих приманок в лесхозах Республики Беларусь

Лесхоз	Район	Количество доз
1	2	3
ГЛХУ «Кобринский лесхоз»	Кобринский	7800
ГЛХУ «Пружанский лесхоз»	Пружанский	12000
ГЛХУ «Бешенковичский лесхоз»	Бешенковичский	11300
ГЛХУ «Витебский лесхоз»	Витебский	12800
ГЛХУ «Богушевский лесхоз»	Сеннский	8600
ГЛХУ «Глубокский лесхоз»	Глубокский	7100
ГЛХУ «Гомельский лесхоз»	Гомельский / Добрушский	30000 / 14300
ГЛХУ «Гродненский лесхоз»	Гродненский	9320
ГЛХУ «Лидский лесхоз»	Вороновский	10000
ГЛХУ «Щучинский лесхоз»	Мостовский	9700
ГЛХУ «Воложинский лесхоз»	Воложинский	19500
ГЛХУ «Минский лесхоз»	Минский и Дзержинский	12200
ГЛХУ «Узденский лесхоз»	Узденский	14300
ГЛХУ «Могилевский лесхоз»	Могилевский	28600
ГЛХУ «Глусский лесхоз»	Глусский	11500
ГЛХУ «Новогрудский лесхоз»	Новогрудский/ Кореличский	10800/ 3000
ГЛХУ «Ивьевский лесхоз»	Ивьевский	3000
Всего		235820

Вакцина распространялась из расчета 15 приманок на 1 км². Обработано 15721 км² неблагополучных и угрожаемых по бешенству угодий.

Полученные данные свидетельствуют о снижении заболеваемости бешенством животных в зонах распространения приманок и в целом по республике а следовательно и об эффективности вакцины. Так, если в 2006 г. было зарегистрировано 1614 случаев бешенства у животных в республике, то в 2007 г., после проведения компании пероральной вакцинации только- 898, а за 7 месяцев 2008 г. только 470

Изучение срока годности жидкой антирабической вакцины

Для установления срока годности сконструированной жидкой культуральной антирабической вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре минус 20°С. При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 24 месяцев. Однако титр вируса и иммуногенная активность ее после 12 месячного срока хранения снижалась. Поэтому в условиях хранения при минус 20°С оптимальным сроком годности вакцины следует считать 12 месяцев с момента изготовления (таблица 5).

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Таблица 5 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной антирабической вакцины при разных сроках хранения (n=3)

Показатель	Срок хранения, месяцы				
	0	6	12	18	24
Титр вируса (lg ЛД ₅₀ /мл)	6,8	6,6	5,7	5,5	3,5
Иммуногенная активность (МЕ)	1,2±0,01	1,10±0,02	1,02±0,01	1,0±0,02	0,7±0,01
Стерильность	+	+	+	+	+
Безвредность	+	+	+	+	+

Примечание – положительный результат (+)

На основании проведенных исследований разработаны проекты ТНПА (ТУ, инструкция по изготовлению и контролю, инструкция по применению) на вакцину антирабическую жидкую культуральную для пероральной иммунизации диких плотоядных животных из штамма КМИЭВ-94.

ВЫВОДЫ

С целью специфической профилактики бешенства сконструирована вакцина для пероральной вакцинации диких плотоядных, которая включает селекционированный вакцинный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 с титром 6,5 lg ЛД₅₀/мл, выращенный роллерным способом на культуре клеток Vero, ПС или ВНК-21.

Сконструированная вакцина не контаминирована посторонней микрофлорой, безвредна для плотоядных животных и в дозе 2,0 см³ индуцирует у них выработку антирабических антител в высоких титрах (свыше 1,9-2,0 lg).

Для применения вакцина в дозе 2,0 см³ вводится в приманки (куриные головы, кусочки мяса, рыбы массой 30-50 г) и туда же вводится в качестве биомаркера 150 мг тетрациклина гидрохлорида. Хранятся и распространяются приманки в замороженном состоянии.

Вакцина успешно прошла комиссионные испытания и в количестве 235820 доз применена в 17 лесхозах республики на площади 15721 км², что позволило снизить заболеваемость животных бешенством с 1614 случаев в 2007 г. до 898 в 2007 г. и до 470 в 2008 г. (за 7 месяцев).

Подготовлены проекты ТНПА на вакцину (ТУ, инструкция по изготовлению и контролю, инструкция по применению) и рекомендации по профилактике бешенства в природных условиях, включающие методику пероральной вакцинации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ковалев, Н.А. Зооантропонозы. Эпизоотическая и эпидемическая ситуация в Беларуси / Н.А. Ковалев, Е.В.Гусева, А.А. Гусев // Экологический мир. – 2007, № 3/4. – С. 38–42.

2. Таршис, М.Г. Бешенство животных / М.Г. Таршис, Н.А. Ковалев, П.П. Кузнецов. – Мн.: «Ураджай», 1990. – 168 с.

3. Методы лабораторных исследований по бешенству. – Женева, ВОЗ, 1975, 353 с.