

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук
Бутько Л.В., кандидат ветеринарных наук *

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

**ГУО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск*

**ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУМЫ,
ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО
ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ.
ЧАСТЬ 1. РЕПРОДУКЦИЯ И ИНАКТИВАЦИЯ
ВАКЦИННЫХ ВИРУСОВ**

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство, чума, инфекционный гепатит и парвовирусный энтерит – наиболее распространенные вирусные болезни плотоядных животных, наносящие значительный экономический ущерб и представляющие социальную опасность.

Бешенство является исключительно опасным, абсолютно смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека и занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии. Заболевание бешенством имеет широкое распространение во многих странах мира, в т.ч. и в Беларуси. Причем напряженность эпизоотической ситуации по этой инфекции вследствие ее природно-очагового характера, несмотря на проводимые профилактические мероприятия практически не снижается.

Так, если в 2008 г. на территории республики бешенство было выявлено у 1053 животных, то в 2011 у 1108. Положение усугубляется напряженной эпизоотической обстановкой в сопредельных государствах. Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей, так как обращаемость населения в связи с укусами, оцарапываниями и ослюнениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 23-28 тыс. случаев в год. В 2000-2011 гг. отмечены 8 случаев гибели от бешенства людей [3, 4, 5, 6, 11].

Одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Л.Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков. За прошедшие годы появилось много различных

модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства с одной стороны путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцины при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности входящего в состав вакцин вируса.

Для изготовления антирабических вакцин используются следующие штаммы вируса бешенства: Парижский штамм Пастера, PV-11 или PM, SAD, SAD B-19, SAG, CVS, Flury Lep, Flury Hep, Kelev, ERA, VRG, Внуково-32, ТС-80, 71-БелНИИЭВ-ВГНКИ, РВ-97, КМИЭВ-94 и др. [6].

В ветеринарной практике в настоящее время применяются как живые культуральные, так и инактивированные антирабические вакцины.

Живые аттенуированные вакцины готовят, как правило, на основе культур клеток (Vero, почка сирийского хомячка, ВНК-21, почка поросенка, сайги и др.) или развивающихся куриных эмбрионов.

В Республике Беларусь, России, как и во многих других странах, парентеральное применение живых антирабических вакцин запрещено. В России производятся и используются следующие инактивированные культуральные антирабические вакцины: – вакцина из штамма Внуково-32; – вакцина из штамма вируса бешенства Щелково-51 [8]; – вакцина из штамма ТС-80 [1]; – вакцина из штамма РВ-97 (дериват штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ) [2].

В Беларуси РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелеского» разработана и производится жидкая культуральная адсорбированная инактивированная вакцина из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и его модификации КМИЭВ-94 [5,6].

Существенный удельный вес в инфекционной патологии плотоядных животных занимает чума [10]. К чуме плотоядных восприимчивы собаки, норки, песцы, соболи, хорьки, серебристо-черные лисицы и другие звери всех возрастов. При чуме у животных поражаются дыхательная, иммунная, кровеносная, нервная и пищеварительная системы. Летальность молодняка пушных зверей и собак при вспышке чумы плотоядных может достигать 80–100%, а взрослых животных 30–50%. Возбудитель устойчив к действию внешних факторов.

В выделениях больных животных вирус во внешней среде при температуре плюс 4⁰С сохраняется до 15 дней. Источником инфекции являются больные и переболевшие животные, выделяющие вирус различными путями.

Для профилактики чумы плотоядных в Республике Беларусь применяются следующие вакцины: живая культуральная моновакцина российского производства, а также поливалентные вакцины: Гексаканивак, Биофак, Мультикан-4, Мультикан-8, Гексадог, Нобивак, Эурикан, Пентадог.

Парвовирусная инфекция собак, которая впервые была зарегистрирована в 1976 г. в Бельгии, в настоящее время широко распространена во многих странах мира. Парвовирусным энтеритом (ПВЭ) болеют собаки, могут болеть кошки, лисицы, еноты, песцы, норки и другие животные. Данное заболевание, как правило, имеет стационарный характер с охватом значительного количества животных. Наибольшую опасность она представляет для щенят в возрасте до 6 месяцев. У них летальность составляет 25 %, но может достигать и 80 % [9, 10, 12]. Хотя официальной статистики по указанному заболеванию в Беларуси нет, косвенные источники (объемы вакцинаций) позволяют судить о его значительном распространении.

Самым надежным способом профилактики парвовирусного энтерита является вакцинация. Для этой цели используются инактивированные и живые аттенуированные вакцины [10, 12]. Из инактивированных вакцин в странах СНГ в настоящее время используют препарат «Биовак. Д» из штамма Геркулес, препарат фирмы «Ветзвероцентр» из штамма Д (в моновалентном виде и как компонент ассоциированных вакцин).

Живые вакцины против парвовирусного энтерита готовят из аттенуированных штаммов парвовируса собак (ПВС) или вируса панлейкемии кошек. Для этой цели применяют моновалентные вакцины из ПВС ЗАО «Фирма Ветзвероцентр», Вангард Purru CPV (Пфайзер), Биовак Д (ООО «Биоцентр»), Нобивак Парво-С (Интервет), Квантум Р (Питман-Муур), Коммандер Parvo MLV (Биокар), Неомар (Неотех) и др. [12].

Инфекционный гепатит или болезнь Рубарта – острая контагиозная болезнь плотоядных, протекающая с лихорадкой, воспалением конъюнктивы, слизистой оболочки носовой полости, желудочно-кишечного тракта, печени и желчного пузыря, а иногда и с поражением центральной нервной системы. Возбудителем заболевания является аденовирус 1 го типа (СAB-1) [10].

В естественных условиях к инфекционному гепатиту восприимчивы собаки всех возрастов и пород, а также лисицы, песцы, еноты и другие пушные звери. Продолжается болезнь от нескольких дней до 2 – 3 недель, инкубационный период составляет 3–9 дней. Летальный исход чаще наблюдается у щенков. Возбудитель заболевания устойчив к воздействию физико-химических факторов. В секретах больных животных он сохраняет активность до нескольких месяцев, при замораживании и высушивании до 3 – 5 лет. Высокая температура действует на вирус губительно, при 100⁰С он теряет вирулентность за 1 минуту.

С целью профилактики заболевания в ряде стран применяют инактивированные вакцины. Эти вакцины после двукратного введения вызывают не менее чем у 85% животных напряженный иммунитет продолжительностью до 1 года. Разработано около 20 живых вакцин на основе аттенуированных штаммов. Вакцины против инфекционного гепатита чаще

всего ассоциируют с другими компонентами – вирусами чумы, бешенства и парвовирусного энтерита плотоядных [9, 12].

Вакцины против указанных заболеваний в Республике Беларусь не производятся, а закупаются по импорту, главным образом в России, Голландии, Франции. Поэтому разработка и налаживание производства поливалентной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных будет иметь важное экономическое значение и позволит сократить затраты валюты на закупку за рубежом аналогичного препарата. Особенно если учесть, что в Беларуси ежегодно прививается около 900 тыс. собак против бешенства, парвовирусного энтерита и чумы и свыше 900 тыс. норок против чумы. Наши исследования были посвящены созданию поливалентной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита плотоядных животных. На первом этапе работы необходимо было разработать рациональные способы накопления вакцинного сырья и отработать способы его инактивации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы вирусов

Фиксированный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 был селекционирован в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и адаптирован к культурам клеток Vero, PC, ВНК-21.

Вирусы парвовирусного энтерита собак штамм КМИЭВ-14в, чумы плотоядных штамм КМИЭВ-12В и инфекционного гепатита штамм КМИЭВ-83 селекционированы из выделенных от собак эпизоотических штаммов и адаптированы: парвовирус к культурам клеток CrFK и MDCK, вирус чумы к культуре клеток Vero, вирус инфекционного гепатита – культуре клеток MDCK.

Эталонный фиксированный вирус бешенства штамм CVS в виде мозговой культуры получен из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. В ИЭВ им. С.Н. Вышелесского депонирована его мозговая культура.

Культуры клеток

Для культивирования фиксированного вируса бешенства использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/13, вируса парвовирусного энтерита собак – культуру клеток CrFK, вируса чумы плотоядных – культуру клеток Vero, инфекционного гепатита – культуру клеток MDCK.

Фармпрепараты

Для инактивации вакцинных вирусов использовали теотропин по ТУ 931004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (Покров)

Титрация вирусов

Титрование вируса бешенства проводили на белых мышах, а также методом RFFIT по общепринятым методикам [7].

Титрацию вируса парвовирусного энтерита проводили в РГА со свинными эритроцитами и с помощью ИФА. Титрацию вируса чумы плотоядных проводили на культуре клеток Vero, а инфекционного гепатита на культуре клеток MDCK по общепринятым методикам [7, 10].

Определение контаминации вирусных материалов бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196-197, 2000-2001, ГФ Р.Б., Т.1. 2012. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение вирусного сырья для изготовления вакцины

Культивирование вирусов проводили роллерным в 2-литровых роллерах или статическим в 1,5-литровых матрасах способами при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Скорость вращения роллеров составляла 8-12 об/мин. В качестве питательной среды использовали среды Игла или Игла МЕМ с добавлением 2-10 % сыворотки крупного рогатого скота.

Вируса вносили в питательную среду одновременно с клетками, концентрация которых составляет 0,1-0,2 млн./мл. Для культивирования вируса бешенства использовали клетки ВНК-21/13, вируса чумы плотоядных – клетки VERO, вируса парвовирусного энтерита – клетки CrFK, вируса инфекционного гепатита-клетки- MDCK. Заражающая доза вируса бешенства составляла 0,1-0,6 $\text{MLD}_{50}/\text{кл}$, вируса чумы плотоядных – $0,6\pm 0,14 \text{TKID}_{50}/\text{кл}$, вируса парвовирусного энтерита – 0,0005 ГАЕ/кл, вируса инфекционного гепатита-0,1-0,3 $\text{TKID}_{50}/\text{кл}$

Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. Урожай собирали через 3-7 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость матрасы и роллеры замораживали при температуре 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.

Все четыре вирусных материала были стерильными в отношении бактериальной и грибковой флоры.

Наибольшее накопление вирусов происходило при роллерном способе выращивания. Так, титр вируса бешенства при роллерном способе культивирования составлял 7,0 lg и был на 0,2 lg выше, чем при статическом способе, титр вируса чумы плотоядных – 4,5 lg или на 0, 5 lg выше, титр вируса инфекционного гепатита-5,0 lg или на 0, 5 lg выше, титр парвовирусного энтерита - $10,0 \log_2$ или на 2 \log_2 выше, чем при стационарном способе культивирования (таблица 1).

Таблица 1– Накопление вакцинных вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита, плотоядных при различных способах культивирования

| № п/п | Наименование вирусов | Наименование культур клеток | Титр вируса при культивировании | |
|-------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | | | роллерным способом | в статических условиях |
| 1 | Вирус бешенства | ВНК-21/13 | 7,0±0,2 | 6,8±0,25 |
| 2 | Вирус чумы плотоядных | Vero | 4,5±0,2 | 4,0±0,1 |
| 3 | Вирус парвовирусного энтерита | CrFK | 10,0±1,0 | 8,0±1,0 |
| 4 | Вирус инфекционного гепатита | MDCK | 4,5±0,1 | 5,0±0,1 |

Примечание – 1. Титр вируса бешенства указан в lg MLD₅₀/мл, вируса чумы плотоядных, инфекционного гепатита в ТЦД₅₀/мл, вируса парвовирусного энтерита в log₂. Данные приведены по 3 повторностям

Инактивация вирусов

Теотропин добавляли к вирусам 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: вирус бешенства путем интрацеребральной инокуляции белым мышам в дозе 0,03 мл, вирус ПВС путем заражения культуры клеток CrFK в дозе 4-8 ГАЕ на пробирку, вирус чумы плотоядных путем заражения культуры клеток Vero в дозе 0,6 ТКИД₅₀/кл. вирус инфекционного гепатита путем заражения культуры клеток МДСК в дозе 0,3 ТКИД₅₀/кл. Исследования проводили в 3-х повторностях.

Было установлено, что теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре 37°C полностью инактивировал все четыре вируса. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титры вирусов (таблица 2).

В дальнейшей своей работе для инактивации вирусов мы использовали временной интервал инактивации 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина, как более полно гарантирующие её полноту.

Таблица 2 – Биологическая активность вирусов бешенства, парвовирусного энтерита, чумы и инфекционного гепатита плотоядных после инактивации теотропином

| № п/п. | Концентрация теотропина, % | Титр вируса до инактивации | Время инактивации, часов | Титр вируса после инактивации |
|--|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <u>Вирус бешенства</u> | | | | |
| 1. | 0,05 | 6,5±0,2 | 12 | 6,1±0,2 |
| 2. | 0,1 | 6,9±0,3 | | 5,0±0,1 |
| 3. | 0,15 | 6,2±0,2 | | 4,0±0,1 |
| 4. | 0,05 | 6,8±0,1 | 24 | 1,8±0,1 |
| 5. | 0,1 | 6,6±0,2 | | 0 |
| 6. | 0,15 | 6,5±0,2 | | 0 |
| 7. | 0,05 | 6,1±0,1 | 36 | 1,5±0,1 |
| 8. | 0,1 | 6,2±0,1 | | 0 |
| 9. | 0,15 | 6,5±0,2 | | 0 |
| <u>Вирус ПЭС</u> | | | | |
| 1. | 0,05 | 8,0±0,5 | 12 | 7,0±0,5 |
| 2. | 0,1 | 8,0±0,5 | | 6,0±0,5 |
| 3. | 0,15 | 8,0±0,5 | | 4,0±0,5 |
| 4. | 0,05 | 7,0±0,5 | 24 | 3,0±0,5 |
| 5. | 0,1 | 7,0±0,5 | | 0 |
| 6. | 0,15 | 7,0±0,5 | | 0 |
| 7. | 0,05 | 9,0±0,5 | 36 | 2,0±0,5 |
| 8. | 0,1 | 9,0±0,5 | | 0 |
| 9. | 0,15 | 9,0±0,5 | | 0 |
| <u>Вирус чумы плотоядных</u> | | | | |
| 1. | 0,05 | 3,6±0,2 | 12 | 3,5±0,2 |
| 2. | 0,1 | 3,6±0,2 | | 3,0±0,2 |
| 3. | 0,15 | 3,6±0,2 | | 2,9±0,2 |
| 4. | 0,05 | 3,6±0,2 | 24 | 1,9±0,2 |
| 5. | 0,1 | 3,6±0,2 | | 0 |
| 6. | 0,15 | 3,6±0,2 | | 0 |
| 7. | 0,05 | 3,5±0,1 | 36 | 1,2±0,1 |
| 8. | 0,1 | 3,5±0,1 | | 0 |
| 9. | 0,15 | 3,5±0,1 | | 0 |
| <u>Вирус инфекционного гепатита плотоядных</u> | | | | |
| 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 антител к вирусу бешенства, чумы плотоядных и инфекционному гепатиту указаны в lg, к вирусу ПЭС – в log₂; * P < 0,01

ВЫВОДЫ

1 Для конструирования тетравакцины использовали вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 с титром 6,8–7,0 lg, вирус чумы плотоядных штамм КМИЭВ-82 с титром 4,5 lg ТЦД, вирус парвовирусного энтерита штамм КМИЭВ-14в с титром 7,0–8,0 log₂, вирус инфекционного гепатита штамм КМИЭВ-83 с титром 4,5–5,0±1,0 lg

2 Эффективной для репродукции вируса бешенства является культура клеток ВНК-21/13, вируса чумы плотоядных – культура клеток Vero, вируса парвовирусного энтерита собак культура клеток CrFK, вируса инфекционного гепатита – культура клеток MDCK.

3 Вирус бешенства с наиболее высокими титрами репродуцируется роллерным способом, остальные вирусы в статистических условиях в 1,5-литровых матрасах или роллерным способом в 2-литровых флаконах. Урожай собирают через 3–7 суток культивирования после замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

4 Вирусное сырье полностью инактивируется теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

ЛИТЕРАТУРА

1 Вишняков, И.Ф., Инактивированная культуральная вакцина против бешенства. И.Ф. Вишняков, И.В. Никитин, В.В. Недосеков. //Ветеринария, 1998, №1, С.22–24.

2 Гочмурадов, М.Г., Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных.// Автореф. дис. канд. вет. наук., Владимир. 1999. – С. 33.

3 Зибицкер, Д.Е., Бешенство и его профилактика. Зибицкер Д.Е., Ковалев Н.А. Мн.,//«Ураджай», 1970. – С. 200.

4 Ковалев, Н.А., Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси. Ковалев Н.А., Усеня М.М., Уласович П.А //Ветеринарная медицина Беларуси, №3, 2002 г. – С. 4-5.

5 Ковалев, Н.А., Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук, 2007, № 2, -С. 80-87.

6 Ковалев, Н.А. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы Ковалев Н.А., Бучукури Д.В.// Ветеринарная наука производству: научные труды, выпуск 40: материалы научно-практической конференции «Основные патологии животных и современные технологии профилактики болезней» – Гродно, 2008. – Т. 2.–С – 80-87.

7 Методы лабораторных исследований по бешенству. –Женева, ВОЗ, 1975. – С. 353.

8 Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г. Кузнецов Н.Н., Иванов В.С. и др. Способ получения антирабической вакцины.

9 Сулимов А.А. и др. Парвовирусный энтерит собак. Сулимов А.А. М., 1984.

10 Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Т.В., Фомина Н.А. //М., -ВНИТИБП, 1988. – С. 928.

11Таршис М.Г. Бешенство животных. Таршис М.Г., Ковалев Н.А., Кузнецов П.П. //- Мн.: «Ураджай», 1990. – С. 168.

12 Шуляк Б.Ф. Вирусные болезни собак. Шуляк Б.Ф. // М., 2004. – С. 560.