

**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. Вышелесского»*

*\*ГУО «Белорусский государственный медицинский университет»*

## **ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУМЫ, ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ. ЧАСТЬ 2. КОНСТРУИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ИММУНОГЕННОСТИ**

### **ВВЕДЕНИЕ**

В части 1 была обоснована актуальность разработки отечественной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных, представлены результаты отработки рационального способа накопления вакцинного сырья и способ его инактивации.

На втором этапе работы по созданию вакцины перед нами стояла **задача** – изыскать оптимальную концентрацию в ней гидроксала, разработать эффективную схему вакцинации и изучить её иммунологическую эффективность.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **Подопытные животные**

Исследования проводили на белых мышах, кроликах и собаках. Для опытов брали мышей массой 15 – 17 г, для титрации вируса и постановки реакции нейтрализации (РН) – массой 6 – 8 г. Использовали кроликов породы Шиншилла, преимущественно самцов, массой 2 – 3 кг и беспородных собак массой 10 – 15 кг.

#### **Препараты. Штаммы вирусов**

При конструировании вакцины использовали инактивированные антигены вируса бешенства – штамм КМИЭВ – 94, вируса чумы плотоядных – штамм КМИЭВ –14В, вируса парвовирусного энтерита – штамм КМИЭВ 12В и вируса инфекционного гепатита – штамм КМИЭВ – 83

При изучении иммунологической эффективности сконструированного образца четырехвалентной вакцины контрольную группу кроликов и собак иммунизировали российской коммерческой вакциной Мультикан–8

(против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирозно-го энтеритов, лептоспироза и бешенства).

Для исследований на бешенство мозга животных, а также для титрации вируса бешенства и определения титров антирабических антител в RFFIT использовали флюоресцирующий антирабический гамма-глобулин «Bio-Rad» французского производства и российский препарат.

Для выявления и титрования вируса парвовирусного энтерита собак использовали диагностический набор Парво-тест для ИФА производства компании «Нарвак» (Россия).

Для титрации в РГА парвовируса плотоядных и определения титра противопарвовирусных антител в РНГА использовали эритроциты свиньи.

В качестве адьюванта использовали – гидроксал по ГОСТ 18287.

#### **Определение титров антител**

Реакцию нейтрализации для определения титров вируснейтрализующих антирабических антител проводили на белых мышах, а также методом RFFIT по общепринятым методикам [8].

Титрацию антител к вирусу парвовирусного энтерита проводили в РТГА со свиньиными эритроцитами с 4 – 8 гемагглютинирующими единицами вируса. Титрацию антител к вирусу чумы плотоядных проводили на культуре клеток Vero, а к вирусу инфекционного гепатита на культуре клеток MDCK по общепринятым методикам [8, 13].

**Определение контаминации вирусных материалов и вакцины 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.

#### **Определение безвредности и реактогенности вакцины**

Объединенную пробу из трех флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины в объеме по 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней. Результаты учитывали по отсутствию местных реакций и выживаемости животных.

#### **Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине**

С целью определения оптимальной концентрации гидроксала в четырехвалентной вакцине в культуральные жидкости вируса бешенства, ПВЭ, инфекционного гепатита и чумы плотоядных добавляли 6% -й гидроксал в количестве 5 и 10%. Затем смесь вирусов с различным количеством 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 бешенства титровали на белых мышах, вируса ПВЭ – в РГА, вируса чумы плотоядных на культуре клеток Vero, а инфекционного гепатита – на MDCK. С целью контроля титрации одновременно подвергали и исходные вируса без добавления гидроксала. Оптимальным считалась то количество гидроксала, при котором он максимально сорбировал вируса. Опыт проводили в 3 повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты определения оптимальной концентрации гидроксала для сорбции вирусов, используемых для конструирования вакцины, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Титры вирусов бешенства, ПВЭ, чумы и инфекционного гепатита плотоядных в надосадочной жидкости после сорбции их гидроксалом различной концентрации

№ п/п	Количество гидроксала в смеси с вирусом, %	Время сорбции, часы	Температура сорбции, °С	Титры вируса в надосадочной жидкости
<b>Вирус бешенства</b>				
1.	5	18	4	4,3±0,1
2.	10	18	4	3,2±0,1
3.	Без гидроксала	–	–	6,75±0,2
<b>Вирус ПВЭ</b>				
1.	5	18	4	4,0±1,0
2.	10	18	4	2,0±1,0
3.	Без гидроксала	–	–	8,0±1,0
<b>Вирус чумы плотоядных</b>				
1.	5	18	4	3,0±0,2
2.	10	18	4	2,0±0,2
3.	Без гидроксала	–	–	3,6±0,2
<b>Вирус инфекционного гепатита</b>				
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 бешенства, инфекционного гепатита и чумы плотоядных указаны в lg, вируса ПВЭ – в log<sub>2</sub>; \* P <0,01

Оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции всех четырех вирусов является 10 об.%. Титр вируса бешенства при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 3,55 lg, титр вируса ПВЭ – на 6,0 log<sub>2</sub>, титр вируса чумы плотоядных – на 1,0 lg, титр вируса инфекционного гепатита – на 2,5 log<sub>2</sub>. В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

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

Для конструирования эффективного экспериментального образца вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных были приготовлены 3 варианта препарата из инактивированных теотропином неконтаминированных вирусов с добавлением 10 об% гидроксала по следующей схеме (таблица 2).

Таблица 2 – Схема компоновки вариантов вакцины

№ п/п	Антиген вируса	Объем антигенов (см <sup>3</sup> ) на 100 см <sup>3</sup> вакцины		
		1 вариант	2 вариант	3 вариант
1.	Бешенство	25,0	30,0	25,0
2.	Чума плотоядных	30,0	25,0	25,0
3.	Парвовирус	25,0	20,0	25,0
4.	Инфекционный гепатит	20,0	25,0	25,0

С целью проверки безвредности и иммунологической эффективности приготовленных вариантов вакцины в опыт были взяты 24 кролика, разделенных на 8 групп по 3 в каждой. Кроликам 1 группы введено внутримышечно по 2 см<sup>3</sup> вакцины первого варианта, второй – такой же объем вакцины второго варианта, кроликам 3 группы – такой же объем вакцины третьего варианта. Кроликам четвертой группы вводили 0,7 см<sup>3</sup> антигена вируса бешенства, пятой группе – 0,7 см<sup>3</sup> антигена вируса чумы, шестой – 0,7 см<sup>3</sup> антигена парвовирусного энтерита плотоядных, седьмой – 0,7 см<sup>3</sup> антигена инфекционного вируса гепатита и восьмая группа кроликов вакцинированных вакциной Мультикан – 8 в объеме 2 см<sup>3</sup>, служила контролем. Препараты вводили дважды с интервалом 21 день.

Через 14 дней после вакцинации в сыворотке крови животных были определены титр антител против вирусов бешенства, чумы парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных. Результаты определения титра антител приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Титр специфических антител у кроликов, вакцинированных вариантами четырехвалентной жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и вирусного гепатита плотоядных

№ п/п	Варианты вакцин	Объем, см <sup>3</sup>	Количество кроликов	Титры антител (log <sub>2</sub> ) через 14 дней после вакцинации к вирусам			
				Бешенства log <sub>2</sub>	чумы log <sub>2</sub>	Парвовирусу log <sub>2</sub>	вирусного гепатита
1.	Первый	2,0	3	7,0±1,0	5,0±1,0	7,0±1,0	6,0±1,0
2.	Второй	2,0	3	6,0±1,0	6,0±1,0	7,0±1,0	7,0±1,0
3.	Третий	2,0	3	6,0±1,0	5,0±1,0	<b>8,0±1,0*</b>	<b>7,0±1,0</b>
Контроль							
4.	Антиген вируса бешенства	0,5	3	6,0±1,0			
5.	Антиген вируса чумы	0,5	3		5,0±1,0		
6.	Антиген парвовируса	0,5	3			8,0±1,0	
7.	Антиген вируса гепатита	0,5	3				7,0±1,0
8.	Вакцина Мультикан – 8	2,0	3	6,0±1,0	5,0±1,0	7,0±1,0	7,0±1,0

Примечание – \* P < 0,01

Не отмечено достоверных отличий в показателях титра антител у кроликов, вакцинированных тремя вариантами сконструированной вакцины. Титр антител против вируса бешенства в РН на белых мышах составляли  $6,0 \pm 1,0 - 7,0 \pm 1,0 \log_2$ , титр антигемагглютининов к парвовирусному энтериту  $7,0 \pm 1,0 - 8,0 \pm 1,0 \log_2$ , титр вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных  $5,0 \pm 1,0 - 6,0 \pm 1,0 \log$ , титр вируснейтрализующих антител к вирусу инфекционного гепатита  $7,0 \pm 1,0$ . Примерно такой же титр антител был и при вакцинации животных монокомпонентами вирусов в объемах, входящих в вакцину, а также вакциной Мультикан – 8, что свидетельствует об отсутствии конкуренции вирусов в вакцине, а также о том, что по своей иммуногенной эффективности сконструированная вакцина не уступает коммерческой.

Исходя из этого, за окончательный принят вариант вакцины, включающий антигены вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита, плотоядных в равных соотношениях.

Проверка иммунологической эффективности экспериментального образца четырехвалентной культуральной вакцины против бешенства, парвовирусного энтерита, вирусного гепатита и чумы плотоядных проведена 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 четырехвалентной вакцины двукратно по  $2,0 \text{ см}^3$  с интервалом 21 день. Животные второй группы для контроля по такой же схеме вакцинированы Мультикан – 8. Вакцины вводили внутримышечно в области бедра. Наблюдение за животными вели 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 титра антител.

Об иммунологической эффективности вакцины судили по титру специфических антител у вакцинированных животных. Результаты определения иммунологической эффективности сконструированного экспериментального образца вакцины представлены в табл.4

Таблица 4 – Титр специфических антител против вируса бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных у собак, вакцинированных четырехвалентной вакциной

№ Группы	Вакцина	Доза, см <sup>3</sup>	Титр антител ( $\log_2$ ) через 14 дней после вакцинации			
			антирабических	противопарвовирусных	противочумных	противогепатитных
1	4-х валентная	2,0+2,0	$6 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$
2	Мультикан-8	2,0+2,0	$6 \pm 1,0$	$7,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$

У животных, привитых сконструированной четырехвалентной вакциной, титр антител к вирусу бешенства, парвовирусу, вирусу чумы и инфекционного гепатита плотоядных на 14 день после вакцинации были относительно высокими и практически не отличались от титра антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан – 8. Все собаки в течение 40 дней после вакцинации оставались клинически здоровыми. Отсутствовала местная реакция на месте введения вакцин.

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 иммуногенную активность, бактериальную и грибковую контаминацию и безвредность через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре 4 – 8°C.

Титр антител к вирусам бешенства, чумы, гепатита и ПВС определяли у 3 кроликов, вакцинированных сконструированной вакциной с различным сроком хранения внутримышечно в дозе 2 см<sup>3</sup>, двукратно с интервалом 21 день.

Установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 18 месяцев. Хотя иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения незначительно снижалась. Поэтому в условиях хранения при температуре 4 – 8°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 5).

Таблица 5 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных через различные сроки хранения (n=3)

№	Показатели	Сроки хранения (месяцев) и титры антител (log <sub>2</sub> )		
		6	12	18
1	Иммуногенная активность	6±1	5±1	5±1
		8±1	7±1	6±1*
		5±1	4±1	4±1
		6±1	5±1	5±1
2	Стерильность	+	+	+
3	Безвредность	+	+	+

Примечание – «+» положительный результат; в каждой графе первыми указаны титры антител к вирусу бешенства, затем к парвовирусу, чуме и гепатиту; \* P < 0,01

## ВЫВОДЫ

1 Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против бешенства, чумы парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных является безвредным, стерильным и высоко иммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства.

2 Способ изготовления вакцины включает репродукцию вирусов и их инактивацию и конструирование вакцины. Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает смешанные в равных объемах антигены вируса бешенства, вируса чумы плотоядных, вируса ПВС, вируса инфекционного гепатита, в качестве адьюванта – гидроксид алюминия в концентрации 10 об%.

3 При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно внутримышечно с интервалом 21 день в объеме 2,0 см<sup>3</sup> через 28 – 35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры антител  $6,0 \pm 1,0 - 7,0 \pm 1,0 \log_2$  против вируса бешенства,  $5,0 \pm 1,0 - 6,0 \log_2$  против вируса чумы,  $7,0 \pm 1,0 - 8,0 \pm 1,0 \log_2$  против ПВЭ, –  $7,0 \pm 1,0 \log_2$  против вирусного гепатита. Примерно такие же титры антител имели животные при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан - 8. Следовательно, сконструированная вакцина может быть рекомендована для внедрения в практику.

4 Хранение при температуре плюс 4 – 8<sup>0</sup>С обеспечивает годность вакцины в течение 12 месяцев со дня изготовления.

5 На основании проведенных исследований разработаны ТНПА (ТУ, технологический регламент, инструкция по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных.

## ЛИТЕРАТУРА

1 Barth, R. Vnukovo – 32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans. Barth R. Franke V., Selimov M.A //Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. Geneva, 1996. –P.310 – 313.

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

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

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

5 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.

6 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.

7 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.

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

9 Назаров, В.П. Бешенство животных. Назаров В.П.// – М., Сельхозгиз, 1961 – 160с.

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

11 Селимов М.А. Бешенство. Селимов М.А. – М., 1978, – 336 с.

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

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

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

15 Шуляк, Б.Ф. Вирусные болезни собак. Шуляк Б.Ф. // М., 2004. – 560с.