

УДК 619:615.371:636:619.097.3

*Д. В. БУЧУКУРИ, Н. А. КОВАЛЕВ, М. М. УСЕНЯ*

**ПРОТИВОЭПИЗОТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ  
ИЗ ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА КМИЭВ-94 ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ  
ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА**

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселеского*

*(Поступила в редакцию 16.09.2008)*

Бешенство – опасное вирусное заболевание всех теплокровных животных и человека, при появлении клинических признаков которого неминуемо наступает летальный исход.

Несмотря на то что в мире в решении проблем, связанных с профилактикой бешенства, достигнуты большие успехи, множество вопросов все еще остается нерешенными. Бешенство по степени распространения, тяжести проявления, социально-экономической значимости занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии животных и человека. По данным экспертов ВОЗ и МЭБ, ежегодно в мире от бешенства погибают от 45 до 55 тыс. человек и более 1 млн животных. В последние десятилетия это заболевание получило широкое распространение и в Республике Беларусь. Напряженность эпизоотической ситуации усугубляется широким распространением бешенства среди диких плотоядных в сопредельных государствах и прозрачностью государственных границ для миграции животных. По Данным МЭБ, в 2007 г. в Польше зарегистрировано 40 случаев бешенства у животных, в Литве – 451, Латвии – 148, Европейской части России – 2267, Украине – 2183 [12].

В Республике Беларусь в 1995 г. было выявлено 14 случаев заболевания, однако в последующие годы наблюдался ощутимый рост случаев силватического бешенства. В 1999 г. диагноз подтвержден в 130 случаях, 2000 г. – в 358, 2001 г. – 504, 2002 г. – 832, 2003 г. – в 1 143 случаях. В 2004 г. ситуация несколько улучшилась (226 случаев), но в 2005–2007 гг. снова наметилась тенденция роста. Так, в 2005 г. бешенство выявлено у 626, в 2006 г. – у 1614 и в 2007 г. – у 898 животных.

Распространение бешенства среди животных создает реальную угрозу здоровью и жизни людей. Количество обращений населения в связи с укусами, оцарапыванием и ослюнением животными в 2007 г. составило 24629 случаев. В 2000–2006 гг. зарегистрировано 6 случаев гибели людей от гидрофобии [2].

В последние десятилетия резервуаром и главным источником вируса бешенства в Беларуси являются дикие плотоядные, в первую очередь лисицы и енотовидные собаки, на долю которых приходится приблизительно 72% случаев заболевания. Являясь основным вектором распространения бешенства, они непосредственно или через собак и кошек заражают бешенством домашних, сельскохозяйственных животных и человека. Следовательно, наиболее эффективным способом борьбы с бешенством является ликвидация очагов инфекции в популяциях лисиц и других плотоядных. Для этого осуществляемые меры борьбы с бешенством должны быть направлены на снижение плотности популяции данного вида животных. Комитет экспертов ВОЗ считает, что для предупреждения роста эпизоотии бешенства плотность лисиц не должна превышать двух особей на 10 км<sup>2</sup>. Однако проводимые мероприятия, направленные на снижение численности лисиц, такие как отстрел, газация нор, отравление приманками, гормональная сте-

рилизация и другие, являются полеативными, дают лишь временный эффект и не решают проблему, о чем свидетельствует опыт ряда европейских стран [9]. Кроме того, эти мероприятия могут нарушить экологическое равновесие в природе и приводят к отрицательным последствиям.

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

Для изготовления антирабических вакцин перорального применения в настоящее время в различных странах используют ряд аттенуированных модифицированных штаммов в том числе генно-инженерные рекомбинанты, PV Paris [10], SAD [11], SADB19 [15], SAG1, SAG2 [7], Внуково-32/107 [13], ТС-80 [6], РВ-97 [5], VRG [14].

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского в 80-х годах XX столетия для пероральной вакцинации диких плотоядных животных против бешенства предложил вакцину из штамма 71-БелНИИЭВ-ВГНКИ, которая в практических условиях показала удовлетворительную эффективность [1]. Однако вирус, использовавшийся для приготовления вакцины, накапливался в первичной культуре клеток ПК и ФЭК в относительно низком титре, что вынуждало применять ее в сравнительно больших дозах (5 мл на приманку) и значительно удорожало стоимость вакцинации. В ходе дальнейших исследований была сконструирована новая высокоиммуногенная, технологически экономичная вакцина из модифицированного высокоиммуногенного штамма вируса бешенства КМИЭВ-94 для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства и отработана рациональная технология ее приготовления [3].

Цель настоящей работы – испытание эффективности сконструированной вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства в природных очагах инфекции.

На первом этапе исследования была изготовлена вакцина для пероральной иммунизации диких плотоядных животных и изучены ее качественные параметры, разработаны методические рекомендации по проведению пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства в природных условиях.

*1.1. Штамм вируса.* Культуральный модифицированный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 был селекционирован в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского» из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ путем последовательных и чередующих пассажей на ранней стадии логотрического роста культур клеток VERO, ПС и ВНК-21.

*1.2. Биопрепараты.* Для диагностических исследований мозга подопытных животных применяли флуоресцирующий антирабический гамма-глобулин (Всероссийский ветеринарный НИИ, г. Казань) и Био-рад (Франция).

*1.3. Культуры клеток.* Для накопления вируса бешенства использовали перевиваемые культуры клеток ПС, VERO и ВНК-21. В качестве питательной среды применяли среду Игла MEM с глутамином и 10% бычьей сыворотки. Культивирование клеток проводили по общепринятой методике при 37 °С в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в 2-литровых флаконах на роллерной установке со скоростью вращения 24–30 об/мин.

*1.4. Титрация вируса.* Титрацию вируса проводили в культуре клеток и на белых мышях.

На культуре клеток титрацию вируса проводили в полистироловых планшетах фирмы FALCOM с 96 лунками и плоским дном в инкубаторе с влажной атмосферой CO<sub>2</sub> при температуре 37±0,5 °С. С этой целью за 10 мин до постановки реакции во взвесь клеток в культуральной среде в концентрации (5–6)·10<sup>5</sup> кл/мл вносили 1% ДЕАЕ-декстрана при медленном помешивании.

Десятикратные разведения вируса для титрации делали на питательной среде от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>. Из приготовленных разведений вируса сверху вниз, начиная с наивысшего разведения, микропипеткой вносили в лунки микропланшет вирусосодержащую суспензию – по 100 мкл на лунку. На каждое разведение использовали не менее четырех лунок. После того как разведенный вирус был перенесен в лунки микропланшет, с помощью многоканальной пипетки туда вносили 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 влажной атмосферой 5% CO<sub>2</sub>.

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 надсадок в сосуд с дезраствором и дважды промывали лунки фосфатно-буферным раствором, охлажденным до температуры 4 °С и один раз 80%-ным раствором ацетона. Затем все лунки микропланшет заполняли 80%-ным раствором ацетона и помещали в морозильник на 30 мин при температуре минус 18–20 °С. 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 °С во влажной камере. Конъюгат удаляли, планшеты промывали дважды фосфатно-буферным раствором (первая водяная баня – 1 мин, вторая – 5 мин). Раствор удаляли, планшеты просушивали.

Учет реакции осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа. Реакция считалась положительной, если в лунке обнаруживали хотя бы одну флуоресцирующую клетку. Расчет титра проводили по методу Кербера в модификации Ашмарина. Титр выражали в TCID<sub>50</sub>мл.

Титрование вируса бешенства на белых мышах проводили общепринятым методом [4].

1.5. *Определение контаминации бактериями и грибами* проводили по ГОСТ 28085–89.

На питательных средах с посевами вакцины допускали рост до 30 колоний бактерий, грибов на одну дозу.

1.6. *Определение иммуногенности вакцины* проводили методом RFFIT [8].

1.7. *Технология изготовления вакцины и ее параметры.* Репродукцию вируса проводили на перевиваемых культурах клеток ПС, VERO и ВНК-21. Вирус в количестве 0,1–0,2 МИД<sub>50</sub>мл/кл вносили в питательную среду Игла MEM с клетками в концентрации 0,05–1,50 млн кл/мл и 10% бычьей сыворотки. Культивирование проводили в статичных условиях или на ролевой установке при 37 °С в течение 6 сут. Сбор вирусосодержащей жидкости проводили на 4–6-е сутки. После каждого пассажа вирус титровали на белых мышах или на культурах клеток в полистироловых планшетках, проверяли на бактериальную контаминацию и объединяли в серию.

Изготовленная серия вакцины имела следующие показатели.

1. На питательных средах с посевами и пересевами вакцины рост микроорганизмов в течение 10-дневного срока наблюдения отсутствовал или не превышал 30 колоний на дозу.

2. Инфекционный титр вируса в вакцине составил 6,5 lg LD<sub>50</sub>/мл.

3. Поедаемость вакциносодержащих приманок (куриных голов) у 10 собак, получавших по одной приманке (2 см<sup>3</sup> вакцины), и 10 собак, получавших по две приманки (4 см<sup>3</sup> вакцины), составила 100%.

4. Безвредность вакцины для плотоядных животных. Все собаки, получавшие по одной и две вакциносодержащих приманки (куриные головы) в течение 29 дней, оставались клинически здоровыми без нарушения аппетита и повышения температуры.

5. Иммуногенность вакцины для плотоядных животных. У всех 20 собак, съевших по одной (2 см<sup>3</sup> вакцины) и по две (4 см<sup>3</sup> вакцины) приманке, выявлена положительная сероконверсия. Титры антирабических антител при исследовании по методу RFFIT на 29-й день после поедания приманок увеличились от 0,01 до 1,80–2,40 lg. Существенной разницы в титрах антител у животных первой и второй групп не отмечено. Следовательно, оптимальной дозой вакцины для плотоядных животных следует считать 2 см<sup>3</sup>. Антитела в вышеуказанных титрах, по данным литературы, защищают животных от заражения уличным вирусом бешенства [3].

На втором этапе были проведены испытания эффективности сконструированной антирабической вакцины на территории Воложинского района Минской области с предварительным картографированием эпизоотических очагов бешенства, а также в других регионах.

Воложинский район расположен на северо-западе Минской области и граничит с Минским, Дзержинским, Борисовским и Малодечненским районами Минской области, Ивьевским и Ошмян-

Таблица 1. Очаги и случаи заболевания животных бешенством на территории Воложинского района в 2001–2006 гг. (I квартал)

Сельский совет	Количество	
	очагов заболевания	случаев заболевания
Бабровичский	4	8
Богдановский	3	3
Вишневецкий	4	4
Воложинский	11	11
Городьковский	4	4
Дорский	2	2
Ивенецкий	9	10
Забрезский	3	5
Залесский	3	3
Першайский	8	10
Подберезский	3	3
Пряльнецкий	4	5
Раковский	4	7
Саковщинский	4	4
Сугвоздовский	1	1
Узболодский	1	1
Яршевский	1	1

ским районами Гродненской области. Общая площадь района составляет 1,9 тыс. км<sup>2</sup>. Административно район разделен на 17 сельских советов.

Район является стационарно неблагополучным по бешенству. С 2001 по 2007 г. случаи бешенства среди животных, в том числе диких, регистрировались ежегодно: в 2001 г. – 5 случаев, в 2002 г. – 2, 2003 г. – 38, 2004 г. – 1, 2005 г. – 16, 2006 г. – 29, 2007 г. – 6 случаев. Всего за семь лет зарегистрировано 97 случаев заболевания, из них 81 случай (83%) среди диких плотоядных, главным образом лисиц.

Территория очагов по бешенству охватывает до 70% общей площади района. Наиболее неблагополучные зоны расположены на территории Воложинского, Ивенецкого и Першайского сельских советов (свыше 10 случаев заболевания в каждой), а также на территории Бобровичского и Раковского сельских советов (7 случаев заболеваний в каждой) (табл. 1). По поводу укусов больными бешенством животными ежегодно обращалось до 25–30 человек.

Профилактические мероприятия против бешенства диких плотоядных животных в районе в основном сводились к их отстрелу. Так, в 2001 г. отстреляно 329 животных, в 2002 г. – 338, 2003 г. – 407, 2004 г. – 230, 2005 г. – 268, 2006 г. – 227 и в 2007 г. – 188 животных.

Пероральную вакцинацию диких животных против бешенства в районе начали применять с 2003 г. Однако она носила ограниченный локальный характер с охватом не более 3,0–3,4% площади неблагополучных урочищ. Только в I квартале 2007 г. была осуществлена массовая компания пероральной вакцинации диких плотоядных против бешенства с использованием 20 тыс. доз сконструированной и изготовленной в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского» вакцины из штамма вируса КМИЭВ–94 на 1300 км<sup>2</sup> (83%) площади неблагополучных урочищ.

Для использования вакцину в объеме 2 см<sup>3</sup> вводили в приманки (куриные головы). В качестве биологического маркера поедаемости в приманки вносили по 150 мг тетрациклина гидрохлорида. Упакованные в специальную тару приманки хранились в замороженном состоянии в таком же состоянии распределялись по территории урочищ.

Для проведения пероральной иммунизации диких плотоядных животных в районе были организованы четыре бригады с участием сотрудников районной ветеринарной станции, БООР и лесного хозяйства. Задействованный персонал был ознакомлен с методическими рекомендациями по проведению пероральной иммунизации, эпизоотической ситуацией, картой района по бешенству и с маршрутами по раскладыванию вакциносодержащих приманок.

Раскладывание приманок производили вручную с движущегося автотранспорта, верхом на лошадях и пешим порядком из расчета 15–20 приманок на 1 км<sup>2</sup>, в зависимости от степени напряженности эпизоотического очага. Полную раскладку 20 тыс. приманок произвели в течение двух рабочих дней. Через 3–5 дней после раскладки приманок с помощью охотников выборочно осуществили контроль их поедаемости дикими плотоядными. Она составила в среднем 80–85%.

С целью контроля эффективности пероральной иммунизации диких плотоядных против бешенства в разных природных очагах через 45–60 дней после иммунизации было отстреляно 8 лисиц. Взятые для исследования на наличие тетрациклиновых колец в шлифах зубы и пробы крови на наличие вирусосодержащих антител показали наличие тетрациклиновых колец и поло-

жительную сероконверсию (0,5 МЕ) в шести образцах, что свидетельствует о поедании лисицами минимум одной вакциносодержащей приманки.

После проведения пероральной иммунизации в природно-очаговых зонах в 2007 г. было зарегистрировано шесть, а в 2008 г. всего один случай бешенства у лисицы.

Кроме Воложинского района сконструированная вакцина для пероральной вакцинации диких плотоядных животных применена в 17 лесхозах республики. Всего было распространено 235820 доз вакциносодержащих приманок (табл. 2). Вакцину распространяли из расчета в среднем 15 приманок на 1 км<sup>2</sup>. Обработано 15721 км<sup>2</sup> неблагополучных и угрожаемых по бешенству угодий.

Т а б л и ц а 2. **Распределение антирабических вакциносодержащих приманок по лесхозам на территории Республики Беларусь**

Лесхоз / ГЛХУ	Район	Количество приманок
«Кобринский л/х»	Кобринский	7 800
«Пружанский л/х»	Пружанский	12 000
«Бешенковичский л/х»	Бешенковичский	11 300
«Витебский л/х»	Витебский	12 800
«Богушевский л/х»	Сеннеский	8 600
«Глубокский л/х»	Глубокский	7 100
«Гомельский л/х»	Гомельский и Добрушский	44 300
«Гродненский л/х»	Гродненский	9 320
«Лидский л/х»	Вороновский	10 000
«Щучинский л/х»	Мостовский	9 700
«Воложинский л/х»	Воложинский	19 500
«Минский л/х»	Минский и Дзержинский	12 200
«Узденский л/х»	Узденский	14 300
«Могилевский л/х»	Могилевский	28 600
«Глусский л/х»	Глусский	11 500
«Новогрудский л/х»	Новогрудский и Кореличский	13 800
ГЛХУ «Ивьевский л/х»	Ивьевский	3 000

Полученные данные свидетельствуют о снижении заболеваемости бешенством диких плотоядных в зонах распространения приманок и в целом по республике, а следовательно, об эффективности пероральной вакцинации диких плотоядных против бешенства с помощью предложенной вакцины.

Так, если в 2006 г. было зарегистрировано 1614 случаев бешенства у животных, то в 2007 г. после проведенной кампании пероральной вакцинации только у 898, а за семь месяцев 2008 г. только у 470 животных.

Однако для более кардинального снижения заболеваемости бешенством животных в республике объем пероральной вакцинации диких плотоядных животных должен быть значительно увеличен (до 2,6–3,0 млн приманок) и она должна проводится в течение длительного времени (несколько лет), о чем свидетельствует опыт Чехии, ФРГ и других европейских стран. Такой объем пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства предусмотрен Комплексным планом мероприятий по профилактике бешенства в Республике Беларусь на 2007–2010 годы, утвержденным 13 января 2006 г. № 06/204–582.

## Выводы

1. Сконструированная вакцина для пероральной вакцинации диких плотоядных животных, которая включает селекционированный вакцинный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 с титром 6,5 lg MLD<sub>50/мл</sub>, выращенный роллерным или стационарным способом на перевиваемой культуре клеток ПС, Vero или ВНК-21, является эффективным биопрепаратом для специфической профилактики силватического бешенства в природных условиях.

2. Вакцина не содержит патогенных бактерий или грибов, при попадании внутрь является безвредной для плотоядных животных и в дозе 2,0 см<sup>3</sup> индуцирует у них выработку в защитных титрах антирабических антител.

3. Для применения вакцина в дозе 2,0 см<sup>3</sup> вводится в приманки (куриные головы, кусочки мяса, рыбы, массой 30–50 г, или специальные брикеты) и туда же вводится в качестве биомаркера 150 мг тетрациклина гидрохлорида. Хранятся и распространяются приманки в замороженном состоянии.

4. Применение вакцины в 2007 г. в природно-очаговых зонах по бешенству на территории Воложинского района Минской области и в 17 лесхозах республики на площади 15721 км<sup>2</sup> с выкладкой 235820 вакциносодержащих приманок показала высокую противоэпизоотическую эффективность.

## Литература

1. Вакцина для пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства и способ приготовления вакцин: а. с. № 1120701. СССР / Н. А. Ковалев, Т. Л. Сорокина, Э. В. Ивановский, Д. Ф. Осидзе, А. С. Шашенко, В. П. Давиденко; БелНИИЭВ им. С. Н. Вышелеского и ВГНКИ – № 351 7283; заявл. 01.12 1982; опубл. 22.06.84.
2. Постэкспозиционная химиофилактика бешенства в Республике Беларусь / Н. А. Ковалев [и др.] // Ветеринарная наука производству. – Вып. 39. – 2007. – С. 141–151.
3. Актуальные задачи профилактики бешенства среди диких плотоядных животных // Н. А. Ковалев [и др.]. – Вып. 38. – 2005. – С. 139–141.
4. Методы лабораторных исследований по бешенству. – Женева: ВОЗ, 1975. – 353 с.
5. Испытание иммуногенности и безвредности вирусвакцины против бешенства орального применения // В. В. Михалишин [и др.]. // Нейроинфекции: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2001. – С. 34–36.
6. Перспективы использования штамма ТС-80 вируса бешенства для пероральной иммунизации животных / Е. М. Хрипунов [и др.] // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и зооантропонозными болезнями животных: сб. статей. – Покров, 2000. – С. 88–90.
7. Vaccination against rabies: construction characterization of SAG2, a double a virulent derivate of SAD / F. Lafey [et al.] // Vaccine. – 1994. – Vol. 12. – N 4. – P. 317.
8. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. – 2000. OIE. – P. 283.
9. M a t o u c h, O. Elimination of rabies in the Czech Republic by oral Vaccination of fox / O. Matouch, E. Vitasek // Rabies Bull. Europe. – 2000. – P. 14–15.
10. P e r r i n, P. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture processes: use of serum-free medium and perfusion–reactor system / P. Perrin // Vaccine. – 1995. – Vol. 13. – N 13.
11. P e r e z, O. Paolazzi Production methods for rabies vaccine / O. Perez // Journal of Industrial Microbiology Biotechnology. – 1997. – Vol. 18. – P. 340–347.
12. Rabies Bulletin Europe. – 2007. – Vol. 31. – N 4. – P. 4–19.
13. Oral immunization of Arctic foxes with a live rabies tissue-culture vaccine from the Vnukovo-32 strain / M. A. Selimov [et al.].
14. Primary multiplication site of vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus administered to fox by the oral route / I. Thomas [et al.] // Journal of General Virology. – 1990. – Vol. 71. – P 37–42.
15. Safety studies of oral rabies vaccine SAD B19 Striped Skunk / A. Vos [et al.] // Journal of Wildlife Diseases. – 2002. Vol. 38. – N 2. – P. 428–431.

*J. V. BUCHUKURY, N. A. KOVALIOV, M. M. USENIA*

### **EPIZOOTIC EFFICIENCY OF THE RABIES STRAIN KMIEV 94 FOR ORAL IMMUNIZATION OF WILD CARNIVORES AGAINST RABIES**

#### **Summary**

The results on efficacy of the rabies vaccine for oral immunization of carnivores are presented in the article. The vaccine s КМИЭВ-94 strain was grown in ПС, Vero, or BHK-21 cell cultures.

It was shown that oral immunization of the vaccine in a dose of 2.0 ml<sup>3</sup> was safe for carnivores and induced proper anti-rabies immunity.

The vaccine in a dose of 2.0 ml<sup>3</sup> was injected into baits (chicken head, pieces of beet or fish). Biomarker tetracycline-hydrochloride in a dose of 150 mg per dose was added to baits, too. During 2007 the oral vaccination of wild carnivores against rabies was conducted in the territory of the Vologin district of the Minsk area with the use of about 20000 baits and in 17 Republican forest organizations with the use of about 235820 baits.