

УДК 619:616.98:578.824.11:578.822.2:615.371

Н. А. КОВАЛЕВ, А. А. ГУСЕВ, Д. В. БУЧУКУРИ, М. М. УСЕНЯ, П. А. КРАСОЧКО

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ ЖИДКОЙ
КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СОРБИРОВАННОЙ
ПРОТИВ БЕШЕНСТВА И ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК «ПАРВОРАБ»**

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесского

(Поступила в редакцию 21.09.2010)

Значительный удельный вес в инфекционной патологии плотоядных животных занимает парвовирусный энтерит собак (ПВЭС). Кроме собак им могут болеть кошки, лисицы, еноты, песцы, норки и другие животные. Данное заболевание, как правило, имеет стационарный характер и охватывает значительное количество животных.

Парвовирусная инфекция собак, которая впервые была зарегистрирована в 1976 г. в Бельгии, в настоящее время широко распространена во многих странах мира. Заболеванию подвержены как молодые, так и взрослые животные. Наибольшую опасность ПВЭС представляет для щенят в возрасте до 6 месяцев, так как гибель животных составляет 25%, но может достигать и 80% [1, 2]. Хотя официальной статистики по указанному заболеванию в Республике Беларусь не ведется, косвенные источники (объемы вакцинаций) позволяют судить о его значительном распространении.

Самым надежным способом профилактики парвовирусного энтерита собак является вакцинация. Для этой цели используются инактивированные и живые аттенуированные вакцины [1, 2].

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). Для инактивации вакцинных штаммов парвовирусов применяют формалин, этиленмин или бэта-пропиолактон. С целью повышения иммуногенности к вирусному антигену добавляют адьювант (гидроокись алюминия и др.). У привитых инактивированными вакцинами собак наибольшая напряженность гуморального иммунного ответа достигается через 1–2 недели после двукратной вакцинации и сохраняется до года [2].

Живые вакцины против парвовирусного энтерита собак готовят из аттенуированных штаммов ПВЭС или вируса панлейкемии кошек. Для этой цели применяют моновалентные вакцины против ПВЭС производства ЗАО «Ветзвероцентр», Вангард Purru CPV (Пфайзер), Биовак Д (ООО «Биоцентр»), Нобивак Парво-С (Интернет), Квантум Р (Питман-Мур), Коммандер Parvo MLV (Биокар), Неомар (Неотех) и др. [2]. После двукратного введения живых вакцин у 92% привитых собак обеспечивается иммунитет продолжительностью до года.

В связи с тем, что бешенство и парвовирусный энтерит собак весьма контагиозны и повсеместно имеют широкое распространение, действенным способом их профилактики является практически поголовная вакцинация указанных животных [3–14]. Так, в Беларуси против бешенства ежегодно вакцинируется до 700 тыс. собак. Примерно такое же количество животных вакцинируется и против ПВЭС (хотя точные данные отсутствуют).

Поскольку раздельная вакцинация собак против этих инфекций связана с техническими трудностями и требует значительных затрат труда и времени, в ряде стран были предприняты исследования по конструированию против них бивалентных вакцин, а также поливалентных с включением других вирусных, бактериальных и грибковых компонентов. В России ОАО «Росбио-пром» производит такие вакцины под названием Мультикан–2, Мультикан–4, Мультикан–6,

Мультикан–7, Мультикан–8 и др. В Беларуси указанные вакцины не производятся, а закупаются по импорту в России и других странах (Голландия, Франция). Поэтому разработка и налаживание производства отечественных вакцин против наиболее распространенных заболеваний плотоядных, в частности бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита собак, имеет важное экономическое значение, так как позволит сократить затраты на закупку за рубежом аналогичного препарата.

В Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского была разработана бивалентная жидкая культуральная инактивированная сорбированная вакцина против бешенства и парвовирусного энтерита собак «ПАРВОРАБ», включающая отечественный штамм вируса бешенства КМИЭВ–94, выращенный на клетках ВНК–21 или VERO, и отечественный штамм парвовируса собак КМИЭВ 14в, выращенный на клетках CrFK, смешанные в равных объемах, инактивированные теотропином в 0,15 %-ной концентрации и содержащие в качестве адьюванта 6%-ный гидроксал в концентрации 10 об/ %.

Цель настоящей работы – изучение иммунологической эффективности сконструированной вакцины в комиссионном и производственных опытах.

I этап. Исследования проводили в отделе вирусных инфекций Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, а также в виварии Белорусского государственного медицинского университета и в неблагополучных и угрожаемых по бешенству и парвовирусному энтериту собак регионах республики.

Подопытные животные. Исследования проводили на белых мышах, кроликах и собаках. Нелинейных белых мышей получали из питомника Белорусского государственного медицинского университета и, частично, из питомника Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. Для опытов брали мышей массой 15–17 г, для титрации вируса и постановки реакции нейтрализации (РН) – массой 8–10 г. Кроликов породы Шиншилла, преимущественно самцов, массой 2–3 кг, и серонегативных собак различных пород, массой 10–15 кг, получали из вышеуказанных питомников. Производственные опыты на собаках проводили в виварии Белорусского государственного медицинского университета и на базе Брестской горветстанции.

Штаммы вирусов. Фиксированный вирус бешенства штамм КМИЭВ–94 был селекционирован в Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского из штамма 71 БелНИИЭВ–ВГНКИ и адаптирован к культурам клеток Vero, ПС, ВНК–21. Вирус парвовирусного энтерита собак штамм КМИЭВ–14в селекционирован из выделенного от собак эпизоотического штамма и адаптирован к культурам клеток CrFK и MDCK. Эталонный фиксированный вирус бешенства штамм CVS в виде мозговой культуры получен в лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. В Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского вирус адаптирован к культурам клеток Vero и РЭК.

Биопрепараты. При изучении иммунологической эффективности сконструированной бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита собак животных с целью контроля иммунизировали коммерческой вакциной производства ОАО «Росбиопром» Мультикан–8 (против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства). Для определения титров антирабических антител в RFFIT использовали антирабический гамма-глобулин «Biogad» французского производства.

Определение титра антител. Реакцию нейтрализации для определения титров вируснейтрализующих антител на белых мышах, а также определение титров антирабических антител методом RFFIT проводили по общепринятым методам [8]. Титрацию антител к парвовирусу проводили в РТГА со свинными эритроцитами с 4–8 гемагглютинирующими единицами вируса по общепринятым методикам [10].

Иммунологическая эффективность сконструированного образца бивалентной вакцины испытана в опытах на 16 кроликах, которые были разделены на 4 группы, по 4 головы в каждой. Первую группу животных иммунизировали бивалентной вакциной подкожно в объеме по 2,0 см³ двукратно с интервалом 14 дней. Животным II группы вводили коммерческую вакцину Мультикан–8 (против чумы, парвовирусного и коронавирусного энтерита, аденовирусных инфекций, лептоспироза и бешенства) в том же объеме. III и IV группы животных вакцинировали моноком-

понентами в объеме по 1,0 см³ (контроль). Через 14 и 28 дней от начала иммунизации от животных получены сыворотки крови для определения титров антител против вируса бешенства в РН и против вируса парвовирусного энтерита в РТГА. Половина кроликов всех групп через 28 дней от начала иммунизации была заражена вирусом бешенства штамм CVS путем подкожного введения мозговой суспензии вируса в разведении 1:10 в область губы в объеме 0,2 см³. Результаты учитывали по титрам антител и выживаемости животных (для бешенства) в течение 21-дневного срока после заражения.

Т а б л и ц а 1. Титры гуморальных антител и результат заражения вирусом бешенства кроликов, иммунизированных бивалентной вакциной против бешенства и парвовирусного энтерита собак

Вариант опыта	Наименование вакцины	Кол-во животных в группе	Титры антител против вируса						Результат заражения вирусом CVS*
			бешенства			парвовирусного энтерита			
			0	14-й день	28-й день	0	14-й день	28-й день	$\frac{2}{2}$
I группа	Сконструированная бивалентная	4	0	40	80	0	64	256	$\frac{2}{2}$
II группа	Мультикан-8	4	0	40	80	0	64	256	$\frac{2}{2}$
III группа	Монокомпонент бешенства	4	0	40	80	0	0	0	$\frac{2}{2}$
IV группа	Монокомпонент парвовирусного энтерита	4	0	0	0	0	64	256	$\frac{2}{0}$

* Над чертой – количество зараженных кроликов вирусом бешенства; под чертой – количество выживших.

П р и м е ч а н и е. Титры к вирусу бешенства указаны в обратных абсолютных величинах, к парвовирусу – в log₂. То же для табл. 3, 4.

Как видно из табл. 1, на введение бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита у всех животных получен положительный иммунный ответ на оба вирусных антигена, причем титры антител при введении сконструированной вакцины коррелировали с титрами антител, индуцированных коммерческой вакциной и монокомпонентами бивалентной вакцины. Животные, иммунизированные вакцинами, содержащими антиген вируса бешенства, противостояли заражению вирусом бешенства штамм CVS.

На введение вакцин видимых клинических отклонений у животных не отмечено, аппетит был сохранен. В местах введения препаратов патологических изменений не выявлено.

II этап. Комиссионная проверка экспериментальной серии сконструированной вакцины в количестве 4,0 л проведена комиссией, созданной приказом по РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» № 89 от 30.05.2008 г.

В задачи комиссионной проверки входило – проверить внешний вид вакцины, наличие посторонних примесей; контаминацию бактериями и грибами; безвредность; иммуногенность вакцины для плотоядных животных.

Проверка проведена на базе Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского и вивария Белорусского государственного медицинского университета».

Животные. Белые мыши массой 15–16 г, серонегативные к вирусу бешенства и парвовирусному энтериту, собаки различных пород и возраста массой 5–12 кг.

Определение внешнего вида. Для определения внешнего вида, цвета, наличия посторонних примесей, трещин флаконы с вакциной тщательно просматривали в проходящем свете. Вакцина представляла собой жидкость светло-розового цвета со слабой опалесценцией.

Определение контаминации бактериями и грибами. Для проверки на контаминацию бактериями и грибами вакцину из двух флаконов высевали в пробирки с МПА, агаром Сабуро по

0,5 см³, во флаконы с МПБ и МППБ под вазелиновым маслом – по 1 мл. Посевы проводили в две пробирки и два флакона с каждой средой. Посевы инкубировали в течение 3 дней, после чего из жидких питательных сред во флаконах проводили пересев в 2 пробирки с МПА, МПБ и МППБ под вазелиновым маслом. Питательные среды с посевами выдерживали в течение 10 дней, а с пересевами – в течение 7 дней при температуре 37±0,5 °С (для агара Сауро от 20 до 24 °С). На питательных средах с посевами вакцины рост микроорганизмов отсутствовал.

Определение безвредности. Объединенную пробу из двух флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины, по 0,5 см³. Вакцина была безвредной, мыши в течение 10 суток после введения оставались живыми и клинически здоровыми. На месте инъекции у них не было никаких патологических изменений.

Определение иммуногенной активности вакцины для плотоядных животных. Проверка иммунологической эффективности бивалентной культуральной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита проведена в опыте на собаках. Для этого были подобраны серонегативные животные, которых распределили на четыре группы по принципу аналогов, по 3 гол. в каждой.

Животных I группы вакцинировали бивалентной вакциной двукратно по 2,0 см³ с интервалом 21 день. Вакцину вводили внутримышечно с внутренней поверхности бедра.

Животных II и III групп иммунизировали по такой же схеме моновакцинами антирабическая и антипарвовирусная, по 1,0 см³, а животных IV группы вакциной Мультикан–8, по 2,0 см³.

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: против бешенства определяли в РН на мышах и в RFFIT на культуре клеток, против парвовирусного энтерита – в РТГА. За всеми животными вели наблюдение в течение 21 дня после вакцинации.

Т а б л и ц а 2. Результаты определения иммунологической активности экспериментальной серии бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита собак

Вариант опыта	Вакцина	Титр антител			
		антирабических		антипарвовирусных	
		через 21 день после 1-го введения	через 14 дней после 2-го введения	через 21 день после 1-го введения	через 14 дней после 2-го введения
I группа	Бивалентная	114,2±1,14	183,4±1,13	6,0	7,0
II группа	Антирабическая	115,3±1,07	185,2±1,05	–	–
III группа	Антипарвовирусная	–	–	6,0	8,0
IV группа	Мультикан–8	140,2±1,05	150,3±1,06	6,0	7,0

Как видно из табл. 2, у животных, вакцинированных бивалентной вакциной, титры антител как к вирусу бешенства, так и к парвовирусу на 21-й день после первого введения вакцины и на 14-й день после второго введения были относительно высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных моновакцинами против бешенства и парвовирусного энтерита, а также вакциной Мультикан–8 (против чумы, парвовируса, аденовируса, коронавируса, лептоспироза и бешенства). Все животные в течение 21 дня после вакцинации оставались клинически здоровыми, имели хороший аппетит, какие-либо местные реакции на месте введения вакцины отсутствовали.

На основании полученных данных было сделано заключение, что сконструированная бивалентная культуральная инактивированная сорбированная вакцина против бешенства и парвовирусного энтерита является стерильной в бактериальном и грибковом отношении, безвредной, по своей иммунологической эффективности не уступает моновакцинам, а также коммерческой вакцине российского производства Мультикан–8 и может быть рекомендована для применения в практике.

III этап. В производственном опыте иммунологическая эффективность экспериментальной серии вакцины проверялась согласно программе, утвержденной начальником Главного управления ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 16.07.2009 г., в виварии Белорусского государственного медицинского университета.

С этой целью 15 серонегативных к вирусам бешенства и ПВЭС собак по принципу аналогов были разделены на три группы. Животных I группы (6 голов) вакцинировали сконструированной вакциной двукратно по 2,0 см³ с интервалом 21 день. Вакцину вводили подкожно за лопаткой. Животных II группы (6 голов) с целью контроля иммунизировали в эти же сроки и в этом же объеме вакциной Мультикан–8 (против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства). Животных III группы (неиммунизированные, 3 гол.) служили интактным контролем.

До вакцинации и через 14 дней после вакцинации у всех животных были отобраны пробы крови с целью определения титров антител: против бешенства определяли в РН на мышцах и в RFFIT на культуре клеток, против парвовирусного энтерита – в РТГА. За всеми животными вели наблюдение в течение 21-й дня после вакцинации. Об эффективности вакцины судили по титрам антител у выживших животных.

Результаты определения иммунологической активности вакцины (табл. 3) свидетельствуют, что у животных, вакцинированных бивалентной вакциной, титры антител к обоим вирусам на 21-й день после первого введения вакцины и на 14-й день после второго были высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан–8. В течение 21 дня после вакцинации какие-либо общие и местные реакции на месте введения вакцины отсутствовали.

Т а б л и ц а 3. Результаты определения иммунологической активности бивалентной вакцины против бешенства и ПВЭС

Вариант опыта	Вакцина	Титры антител			
		антирабических		антипарвовирусных	
		через 21 дней после 1-го введения	через 14 дней после 2-го введения	через 21 день после 1-го введения	через 14 дней после 2-го введения
I группа	Бивалентная	116,3±1,24	173,4±1,12	6,0	7,0
II группа	Мультикан–8	130,3±1,06	140,3±1,16	6,0	7,0
III группа	Неиммунизированные животные	–	–	–	–

У трех собак, вакцинированных бивалентной вакциной, титры антител к вирусу бешенства и парвовирусного энтерита собак были проверены через 6 и 12 месяцев. При этом установлено, что к 6 месяцам они снизились до 6±1 log₂, а к 12 месяцам – до 5±1 log₂.

В Брестской горветстанции в течение двух месяцев 2010 г. (июнь-июль) было привито сконструированной вакциной 68 собак разных возрастов и пород, принадлежащих гражданам г. Бреста. Вакцину вводили подкожно за лопаткой дважды с интервалом 21 день в следующих дозах: для собак крупных пород – 2,0 см³, для собак мелких пород – 1,0 см³. Жалобы со стороны владельцев собак, осложнения или заболевания после прививок животных в течение месячного патронажа не отмечены.

На основании результатов производственной проверки были сделаны выводы, что сконструированная вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против бешенства и парвовирусного энтерита собак «ПАРВОРАБ» является стерильной, безвредной, по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине российского производства Мультикан–8 и рекомендуется для применения в практике.

Выводы

Сконструированная жидкая культуральная инактивированная сорбированная вакцина против бешенства и парвовирусного энтерита собак «ПАРВОРАБ», которая в качестве вирусодержащего материала включает смешанные в равных объемах вирус бешенства штамм КМИЭВ–94 в титре 6,8–7,0 lg, выращенный в культуре клеток ВНК–21, и вирус ПВЭС КМИЭВ–14в в титре 7,0–8,0 log₂, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вирусов – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об/%, является безвредным, стерильным и высокоиммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческим вакцинам зарубежного производства.

При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно с интервалом 14–21 день в объеме 2,0 см³ через 28–35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры антител (80–183,4±1,13 против бешенства, 128–256 против ПВЭС), чем при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан–8 (80–150,3±1,06 против бешенства, 64–256 против ПВЭС). Все иммунизированные кролики при заражении вирусом бешенства не заболели. Вакцина успешно прошла комиссионную проверку и рекомендуется для внедрения в практику.

Литература

1. Парвовирусный энтерит собак / А. А. Сулимов [и др.]. – М., 1984. – 68 с.
2. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.]. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 928.
3. Barth, R. Vnukovo–32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans / R. Barth, V. Franke, M.A. Selimov // *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization. – Geneva, 1996. – P. 310–313.
4. Вишняков, И. Ф. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства / И. Ф. Вишняков, И. В. Никитин, В. В. Недосеков // *Ветеринария*. – 1998. – № 1. – С. 22–24.
5. Гочмурадов, М. Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных: автореф. ... дис. канд. вет. наук / М. Г. Гочмурадов. – Владимир, 1999. – С. 33.
6. Зибицкер, Д. Е. Бешенство и его профилактика / Д. Е. Зибицкер, Н. А. Ковалев. – Минск: Ураджай, 1970. – С. 200.
7. Ковалев, Н. А. Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси / Н. А. Ковалев, М. М. Усеня, П. А. Уласович // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2002. – № 3. – С. 4–5.
8. Ковалев, Н. А. Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства / Н. А. Ковалев, Д. В. Бучукури, М. М. Усеня // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. наук*. – 2007. – № 2. – С. 80–87.
9. Ковалев, Н. А. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы / Н. А. Ковалев, Д. В. Бучукури // *Ветеринарная наука производству: науч. тр. Вып. 40: материалы науч.-прак. конф. «Основные патологии животных и современные технологии профилактики болезней» в честь 80-летия НАН Беларуси*. – Гродно, 2008. – Т. 2. – С. 80–87.
10. Методы лабораторных исследований по бешенству. – Женева, ВОЗ, 1975. – С. 353.
11. Назаров, В. П. Бешенство животных / В.П. Назаров. – М.: Сельхозгиз, 1961. – 160 с.
12. Способ получения антирабической вакцины: пат. РФ № 955577 от 20.04.1993 г. / Н. Н. Кузнецов, В. С. Иванов [и др.].
13. Селимов, М. А. Бешенство / М. А. Селимов. – М., 1978. – 336 с.
14. Таршис, М. Г. Бешенство животных / М. Г. Таршис, Н. А. Ковалев, П. П. Кузнецов. – Минск: Ураджай, 1990. – С. 168.

N. A. KOVALIOV, A. A. GUSEV, D. V. BUCHUKURY, M. M. USENIA, P. A. KRASOCHKO

IMMUNOLOGIC EFFICIENCY OF LIQUID CULTURAL INACTIVATED ADJUVANTED VACCINE AGAINST RABIES AND CANINE PARVOVIRUS ENTERITIS “PARVORAB”

Summary

The article presents the results of studies of immunologic efficiency of liquid cultural inactivated adjuvanted vaccine against rabies and canine parvovirus enteritis “PARVORAB” which contains strain KMIEV-14 b with titer 6.8–7.0 lg cultivated in cell culture BHK-21, virus PVES KMIEV-14 b in titer 7.0–8,0 log₂ cultivated in cell culture CRFK, teotropin of 0.15% concentration (inactivator), Hidrocsal of 10% concentration (adjuvant). The vaccine is identified to be a safety, sterile and highly immunogenic preparation which is not inferior to foreign vaccines. The vaccine has been successfully tested and is recommended for practical use.