

УДК 619:615.371/372:636.8

Антигенная активность усовершенствованной вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак «Мультикан-8»

**Алексей Николаевич Мухин**, к.б.н., старший научный сотрудник

**Ольга Васильевна Остапчук**, научный сотрудник

**Милана Анатольевна Лосич**, к.б.н., научный сотрудник

**Ирина Владимировна Непоклонова**, к.в.н., заведующая отделом

**Олег Анатольевич Верховский**, д.б.н., профессор, президент

АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных» (г. Москва)

**Наталья Николаевна Концевая**, к.в.н., зам. начальника ОКК

ООО «Ветбиохим», г. Москва.

**Тарас Иванович Алипер**, д.б.н., профессор, заведующий отделом

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ (г. Москва)

В статье представлены результаты исследования антигенной активности вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак «Мультикан-8» с адьювантом на основе карбомера на 42 щенках 8-12 недельного возраста. **Ключевые слова:** Мультикан-8, вакцина, чума плотоядных, аденовирусные инфекции собак, парвовирусный энтерит собак, коронавирусный энтерит собак, лептоспироз, бешенство, антигенная активность, защитный уровень антител, адьювант, карбомер.

Antigenic activity of the improved variant of the vaccine against distemper, adenovirus infections, parvovirus and coronavirus enteritis, leptospirosis and rabies of dogs "Multican-8"

A.N. Mukhin, O.V. Ostapchuk, M.A. Losich, N.N. Kontsevaya, I.V. Nepoklonova, O.A. Verkhovsky, T.I. Aliper

The article presents results of investigation of antigenic activity a vaccine against canine distemper, adenovirus infection, parvovirus and coronavirus enteritis, leptospirosis and rabies «Multican-8» with adjuvant based on Carbomer on the 8-10 week old puppies (n=42).

**Key words:** "Multican-8", vaccine, canine distemper, canine adenovirus infections, canine parvovirus enteritis, canine coronavirus enteritis, leptospirosis, rabies antigenic activity, adjuvant, carbomer, protective antibody level.

Профилактическая вакцинация, с использованием живых аттенуированных и инактивированных вакцин вот уже более полувека является наиболее эффективным методом борьбы с инфекционными болезнями собак.

Для собак «базовыми», т.е. вакцинами, иммунизация которыми должна быть проведена всем животным, являются вакцины против чумы плотоядных, аденовирусных инфекций, парвовирусного энтерита, лептоспироза и бешенства.

К «дополнительным», но имеющим значение в определенных условиях относятся вакцины против коронавирусного энтерита и парагриппа собак [4, 13, 22].

В нашей стране более 20 лет применяется вакцина «Мультикан-8», содержащая живые аттенуированные штаммы вируса чумы плотоядных, аденовируса 2-го типа, парво- и коронавируса собак и инактивированные производственные штаммы вируса бешенства и лептоспир серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* и *Gruppotyphosa*, а также гидроокись алюминия в качестве адьюванта. Препарат обладает выраженной антигенной и иммуногенной активностями, безопасен для собак [2].

Недостатком этой вакцины является отсутствие возможности подкожного применения - при попадании под кожу входящая в ее состав гидроокись алюминия индуцирует образование местной безболезненной припухлости, которая рассасывается от нескольких дней до 1 – 2 недель. В некоторых случаях на месте введения возможно образование стерильного абсцесса.

В ветеринарии применяют инактивированные вакцины с адьювантом на основе карбомеров [6,7,8,9]. Карбомеры (карбополы)– синтетические высокомолекулярные полимеры акриловой кислоты, сшитые аллиловым эфиром сахарозы или пентаэритрита, которые входят в состав косметических и фармацевтических средств, предназначенных людям [15].

Антигенная активности, т.е. способность вакцины стимулировать синтез специфических антител является важным критерием качества препарата. Существует положительная корреляция между титром выявляемых в реакциях нейтрализации (вирус чумы плотоядных, аденовирус собак 1-го типа, вирус бешенства) или (и) торможения гемагглютинации (РТГА) (парвовирус собак) антител и защитой животных при контрольном заражении.

Цель работы – оценить антигенную активность вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтерита, лептоспироза и бешенства собак с адьювантом на основе карбомера для щенков.

#### **Материалы и методы.**

Для изготовления вакцины использовали:

Живые аттенуированные штаммы, депонированные в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (в настоящее время ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ):

- вируса чумы собак (Canine distemper virus (CDV)) «№37» адаптированный к перевиваемой культуре клеток почки зеленой мартышки Vero с активностью в культуре клеток  $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;

- парвовируса собак (Canine parvovirus 2 (CPV-2)) «№23», адаптированный к перевиваемой культуре клеток почки кошки CRFK с активностью  $4 \times 10^{4,0} \text{ГАЕ}/\text{см}^3$ ;

- аденовируса собак 2-го типа (Canine adenovirus 2 (CAV-2)) «№46», адаптированный к перевиваемой культуре клеток почки собаки MDCK с активностью в культуре клеток  $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;

- коронавируса собак (Canine coronavirus (CCoV)) «№49», адаптированный к перевиваемой культуре клеток почки собаки MDCK с активностью в культуре клеток  $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;

Инактивированные производственные, депонированные в коллекции ФГБУ «ВГНКИ» штаммы:

- инактивированный  $\beta$ -пропиолактоном штамм вируса бешенства ERA-CB-20M, полученный в перевиваемой культуре клеток почки сирийского хомячка ВНК-21 с активностью в культуре клеток  $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;

- инактивированные формальдегидом вакцинные штаммы лептоспир серологических групп Icterohaemorrhagiae, Canicola и Gryppotyphosa одноимённых сероваров.

Перевиваемые линии клеток культивировали стационарным и роллерным методами с использованием общедоступных питательных сред и растворов [1,3].

Инфекционную активность вируса чумы собак, аденовируса собак 2-го типа и коронавируса собак устанавливали титрованием в соответствующей культуре клеток по цитопатическому действию (ЦПД).

Инфекционную активность вируса бешенства до инактивации устанавливали титрованием в культуре клеток ВНК-21 с окраской специфическим флуоресцентным конъюгатом (FITS anti-Rabies monoclonal

globulin, «Fujirebio», USA). Окраску проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Титры агентов рассчитывали методом Рида и Менча, выражая в Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> [1].

Титр парвовируса собак выражали в ГАЕ/см<sup>3</sup> по результатам исследования культуральной жидкости микрометодом в реакции гемагглютинации с эритроцитами свиньи [1].

Концентрацию лептоспир определяли путем подсчета микробных клеток в тёмном поле микроскопа.

Для изготовления лиофилизированного компонента вакцины смешивали осветленные центрифугированием при 4500 об/мин в течение 20 мин при 4-6<sup>0</sup> С вируссодержащие культуральные жидкости, содержащие вирус чумы, аденовирус, парво- и коронавирус собак со стабилизатором и подвергали лиофилизации в соответствии с ТР ООО «Ветбиохим».

Жидкий компонент вакцины (растворитель) изготавливали путем смешивания осветленной центрифугированием при 4500 об/мин в течение 20 мин при 4-6<sup>0</sup> С вируссодержащей культуральные жидкости, содержащей инактивированный вирус бешенства, концентрат лептоспир до конечной концентрации 6X10<sup>8</sup> клеток/см<sup>3</sup> и адьюванта до конечной концентрации 10%.

Адьювантом служила стерилизованная автоклавированием 2%-ная суспензия полимера акриловой кислоты (Corel Pharma Chem, Индия).

Контроль качества полученного препарата осуществляли в соответствии ТР ООО «Ветбиохим» и СТО 76418883-1003-2011. Контаминацию препаратов посторонними вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами исключали общепринятыми методами [24].

Иммуногенную активность изготовленного препарата в отношении вируса бешенства исследовали на беспородных белых мышах по методу НИИ (Национальный институт здоровья, США) [24].

Антигенную активность вакцины исследовали на 42 клинически здоровых ранее не вакцинированных щенках обоих полов в возрасте 8 -12 недель, содержащихся в домашних условиях.

Всем животным дважды с интервалом 21 день подкожно в межлопаточную область вводили исследуемую вакцину в дозе 1см<sup>3</sup>.

До иммунизации, на 21- и 42-й дни после первой вакцинации, у всех животных брали пробы крови.

Сыворотку крови исследовали на наличие специфических антител к вирусу чумы, аденовирусам и коронавирусу собак в реакции нейтрализации, к парвовирусу собак в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с эритроцитами свиньи.

Реакции ставили микрометодом по общепринятым методикам [1].

Наличие специфических антирабических антител определяли методом FAVN [12, 24].

Превентивную активность сывороток вакцинированных животных в отношении лептоспир определяли на золотистых хомяках [5].

До вакцинации у всех животных брали мазки из глотки, глаз и прямой кишки.

Мазки из глотки и глаз исследовали на наличие вируса чумы и аденовирусов собак, с помощью «Набора для выявления антигена вируса чумы собак иммуноферментным анализом (ИФА)» и «Набора для выявления антигенов аденовирусов плотоядных иммуноферментным анализом (ИФА)» («Ветбиохим», Россия) соответственно.

Для выявления парвовируса в мазках из прямой кишки применяли «Набор для выявления антигенов парвовируса собак, вирусов энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом (ИФА)» («Ветбиохим», Россия).

Для выявления генетического материала коронавируса в мазках из прямой кишки использовали тест-систему для выявления и идентификации

коронавирусов кошек и собак методом полимеразной цепной реакции «КОРОНАВИР» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Тест-системы использовались в соответствии с рекомендациями производителей.

В исследованиях использовали только тех животных, результаты тестов материалов от которых на наличие соответствующих возбудителей до начала эксперимента были отрицательными.

**Результаты исследований и обсуждение.** Предварительные исследования изготовленной вакцины показали ее полное соответствие по качественным показателям ТР ООО «Ветбиохим» и СТО 76418883-1003-2011.

Иммуногенная активность вакцины в отношении вируса бешенства (НИН) составила 1,8 МЕ\дозу.

Все животные сохраняли нормальные поведенческие реакции во время и после вакцинации. При подкожной инъекции вакцины не отмечено чрезмерной болевой и аллергической реакций, а возникающая при этом припухлость спонтанно исчезала в течение 12 ч.

Результаты серологических исследований проб сыворотки крови двукратно вакцинированных щенков, представлены на рисунке 1.

У щенков до вакцинации не было вируснейтрализующих антител к вирусу чумы, коронавирусу собак и вирусу бешенства. Титр вируснейтрализующих антител к аденовирусам составил  $<1:2-1:8$  ( $<1-3 \log_2$ , средний геометрический  $0,36 \log_2$ ), а уровень антигемагглютининов к парвовирусу собак был от 1:20 до 1:40 ( $4,32-5,32 \log_2$ , средний геометрический  $4,72 \log_2$ ).

Введение вакцины стимулировало у животных синтез специфических антител, с увеличением их уровня после бустер-вакцинации.

Уровень вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных после однократной вакцинации составил  $4-8 \log_2$  (1:6-1:256) (средний

геометрический  $6,05 \log_2$ ), с увеличением до  $6-9 \log_2$  (1:64-1:512) (средний геометрический  $7,06 \log_2$ ) после второй инъекции препарата.

Титр вируснейтрализующих антител к аденовирусам собак после первого введения вакцины был  $7-8 \log_2$  (1:128-1:256) (средний геометрический  $7,47 \log_2$ ), а после второй инъекции увеличился до  $7-9 \log_2$  (1:128-1:512) (средний геометрический  $8,36 \log_2$ ).

Средний геометрический титр вируснейтрализующих антител к коронавирусу собак составил  $3,31 \log_2$  и  $4,79 \log_2$  после однократной и двукратной вакцинации соответственно.

После первой вакцинации уровень специфических антител к парвовирусу собак, выявляемые в реакции торможения гемагглютинации, повысился до  $9,32 - 10,32 \log_2$  (1:640 – 1:1280) (средний геометрический титр  $9,43 \log_2$ ). Повторная вакцинация привела к его дальнейшему увеличению у части животных до  $11,32 \log_2$  (средний геометрический титр  $9,64 \log_2$ ).

У всех животных после вакцинации выявляли нейтрализующие антитела к вирусу бешенства в титре превышающем необходимые для защиты  $0,5 \text{ ME}/\text{cm}^3$ . После однократной вакцинации –  $1,99-7,92 \text{ ME}/\text{cm}^3$  (средний геометрический  $3,26 \text{ ME}/\text{cm}^3$ ), и  $4,56-10,45 \text{ ME}/\text{cm}^3$  (средний геометрический  $6,5 \text{ ME}/\text{cm}^3$ ) после двукратной.

Превентивная активность сывороток вакцинированных животных в отношении лептоспир представлена на рис.2.

До вакцинации превентивная активность сывороток крови щенков в отношении лептоспир серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* и *Gruppotyphosa* была 10% (средняя по группе).

Сыворотки крови, взятые через 21 день после первой вакцинации, в среднем защищали 60% хомяков при заражении лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae* и 70% животных при заражении лептоспирами серогрупп *Gruppotyphosa* и *Canicola* соответственно.

После двукратной вакцинации сыворотки крови щенков обладали 90% превентивной активностью в отношении лептоспир всех 3-х серогрупп.



Соотношения животных с различным уровнем вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных до и после вакцинации представлены на рисунке 3.

Уже первое введение вакцины позволило защитить щенков от чумы плотоядных – все животные имели уровень антител от 1:16 до >1:128. После второй вакцинации 50% животных имели титр 1:64-1:128, остальные выше, чем 1:128, что превышает протективный уровень вируснейтрализующих антител.

Однократная вакцинация стимулировала у всех щенков защиту от аденовирусных инфекций (Рис.4) – у 42,9 % животных титр антител составил 1:64-1:128, а у 57,1 % более чем 1:128. После бустер-вакцинации животных с титром вируснейтрализующих антител к аденовирусу собак более 1:128 стало 78,6%.

Несмотря на то, что протективным уровнем антител для защиты против парвовируса собак, некоторые исследователи считают 1:10-1:40, мы в своей работе исходили из того, что уровень антигемагглютининов меньший 1:20 не является специфическим (нормальные сыворотки крови собак содержат неспецифические антигемагглютинины), а титр 1:20 - 1:40 недостаточен для надежной защиты.

В нашем эксперименте все животные до вакцинации имели антитела к парвовирусу собак в титре 1:20-1:40. После первой иммунизации уровень антигемагглютининов к парвовирусу собак у 64,3,3 % щенков стал 1:80 - 1:640, а у 35,7% превысил 1:1280. После повторное введение вакцины приблизительно половина экспериментальных щенков имело титры антигемагглютининов к парвовирусу превышающие 1:1280 (Рис.5).

Анализ результатов исследования уровня антирабических антител у вакцинированных щенков (Рис.6) показал, что все животные были защищены от бешенства уже после однократной вакцинации: 42,9% животных имели антитела в титре 1,5- 2,62 МЕ/см<sup>3</sup>, у 57,1 % щенков уровень антител

превысил 3,46 МЕ/см<sup>3</sup>. После бустер-иммунизации у всех животных титр антирабических антител превысил 3,46 МЕ/см<sup>3</sup>.

Применение серологических методов исследования служит надежным средством контроля эффективности вакцин для специфической профилактики инфекционных болезней собак.

Показана положительная корреляция между титром выявляемых в реакциях нейтрализации (РН) или (и) торможения гемагглютинации (РТГА) антител к вирусам чумы плотоядных, аденовирусу собак 1-го типа, парвовирусу собак и защитой животных при контрольном заражении вирулентными вирусами. Величина защитного титра антител в работах различных авторов в связи с использованием разных методов оценки отличается и колеблется в пределах: 1:4-1:16 для вируса чумы плотоядных (РН), 1:2-1:8 для аденовируса собак 1-го типа (РН), 1:10-1:40 для парвовируса собак (РТГА). При этом некоторые иммунизированные животные проявляли устойчивость к контрольному заражению даже при более низком уровне антител [10,11,16,20, 22, 23].

Выявление антирабических антител методом FAVN является «золотым стандартом» по определению протективного уровня вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства. Установлено, что животные с уровнем антител в крови 0,5 МЕ и выше надежно защищены при контакте с вирусом бешенства [12,24].

При защите от коронавирусной инфекции собак ведущая роль принадлежит секреторным иммуноглобулинам слизистых. Наличие гуморальных антител к коронавирусу не всегда коррелирует с защитой при контрольном заражении, однако, сероконверсия после вакцинации свидетельствует о системном иммунном ответе на вакцинацию, что в свою очередь позволит избежать клинических признаков коронавирусной инфекции и значительно сократит время выделения коронавируса с фекалиями у таких животных [14,17,21].

Исследование превентивной активности сывороток крови вакцинированных собак для золотистых хомяков является наиболее информативным, в связи с отсутствием четкой корреляции между наличием специфических антител к лептоспирам и защитой при контрольном заражении [18,19].

**Заключение.** Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о безвредности и высокой антигенной активности вакцины Мультикан-8 с адьювантом на основе карбомера. Препарат был безвреден для животных вызывал у всех иммунизированных им щенков образование специфических антител к возбудителям чумы плотоядных, парво- и коронавирусного энтеритов, аденовирусных инфекций и бешенства. Сыворотки крови вакцинированных песцов обладали превентивной активностью в отношении лептоспир серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Gruppotyphosa* и *Canicola*.

#### Литература

1. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. Москва, 2006.
2. Диагностика и профилактика инфекционных болезней кошек и собак: Руководство для практикующих ветеринарных врачей под редакцией Т.И. Алипера. Москва, 2017; 207 – 212.
3. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии). Москва, 2009.
4. Львов Д.К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Медицинское информационное агентство. Москва, 2013.
5. Малахов Ю.А. и др. Метод оценки напряженности противолептоспирозного иммунитета у сельскохозяйственных животных, Материалы 6-й Всесоюзной научной конференции по лептоспирозу. Баку, 1975; 208-210.

6. Мухин А.Н. и др. Антигенная активность усовершенствованной инактивированной вакцины «Мультикан-8» для песцов. Ветеринария и кормление. 2019. № 6. С. 48-51.
7. Мухин А.Н. и др. Антигенная активность усовершенствованной инактивированной вакцины «Мультифел-4» против панлейкопении, инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и хламидиоза кошек. Ветеринария. 2018. № 9. С. 22-27.
8. Мухин А.Н. и др. «Леоминокс» – новая вакцина против вирусной лейкемии кошек, Труды Московского Международного ветеринарного конгресса. 2009; 6, 7.
9. Раев С.А. и др. Разработка и применение вакцины «ВЕРРЕС-ЦИРКО». Ветеринария сегодня. 2013; 3(6):54 – 59.
10. Abdelmagid O.Y. et al. Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, infectious canine hepatitis virus and distemper virus experimental challenges. Veterinary Therapeutics. 2004; 5, 173-186.
11. Bohm M. et al. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. Veterinary Record. 2004; 154, 457–463.
12. Cliquet F. et al. Development of a fluorescent antibody virusneutralizing test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. J. Immunol. Meth. 1998; 212, 79-87.
13. Day M.J. et al. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World small animal veterinary association (WSAVA). Journal of Small Animal Practice. 2016; 57:E1 – E45.
14. Decaro N. et al. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; 11:102-105.
15. EUROPEAN PHARMACOPOEIA - 8th EDITION. 2013; 1766 – 1768.

- 16.Gray L.K. et al. Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012; 240, 1084–1087.
- 17.Greene C.E. et al. Canine viral enteritis // In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 4th ed., Elsevier, 2012; p. 67-80.
- 18.Klaasen H.L. et al. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology*. 2003; 95, 121–132.
- 19.Martin L.E.R. et al. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2014; 28, 789–792.
- 20.Mouzin D.E. et al. Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *J. of the Am. Vet. Med. Ass.* 2004; 224, 55 –60.
21. Pratelli A. et al. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs. *Vet. Microbiol.* 2004; 99, 43–49.
- 22.Schultz R. D. Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review. *Veterinary Microbiology*. 2006; 117:75 – 79.
- 23.Schultz R. D. et al. Age and Long-term Protective Immunity in Dogs and Cats. *J. Comp. Path.* 2010; 142:102 – 108.
- 24.World Organization of Animal Health (OIE). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 2018; [ttp://www.oie.int/](http://www.oie.int/)

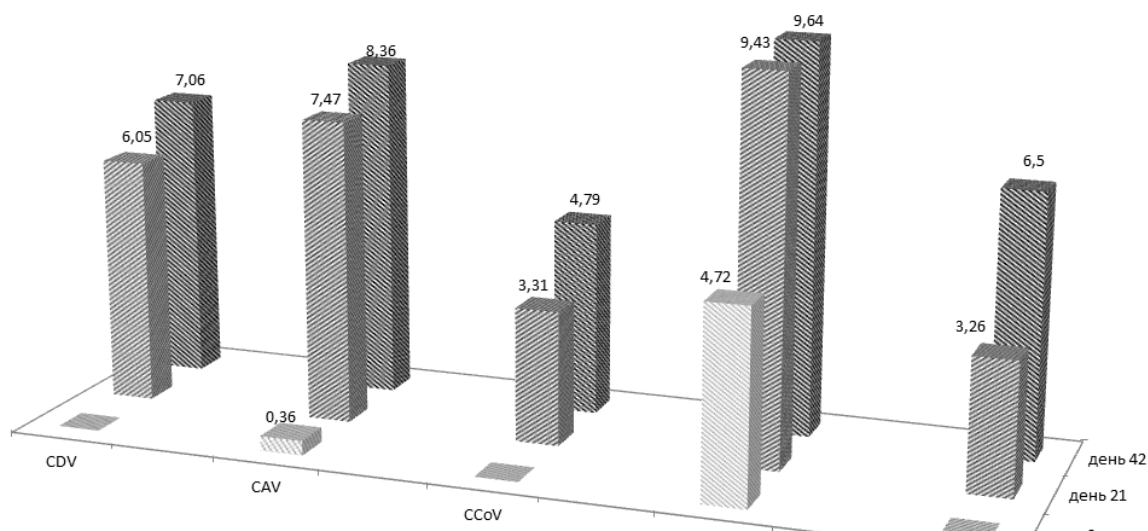


Рис.1. Средний геометрический титр вируснейтрализующих антител к CDV, CAV, CCoV ( $\log_2$ ), вирусу бешенства (МЕ/см<sup>3</sup>) и антигемагглютининов к CPV ( $\log_2$ ) у щенков до и после двукратной вакцинации.

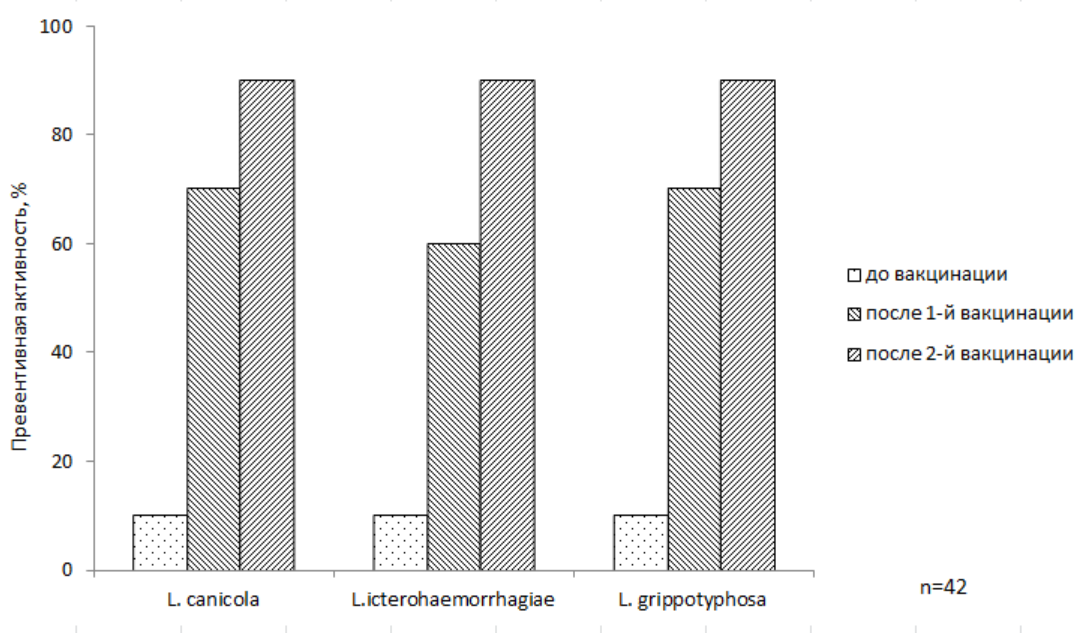


Рис. 2. Превентивная активность сывороток щенков в отношении лептоспир серогрупп Canicola, Icterohaemorrhagiae и Gryppotyphosa до и после двукратной вакцинации.

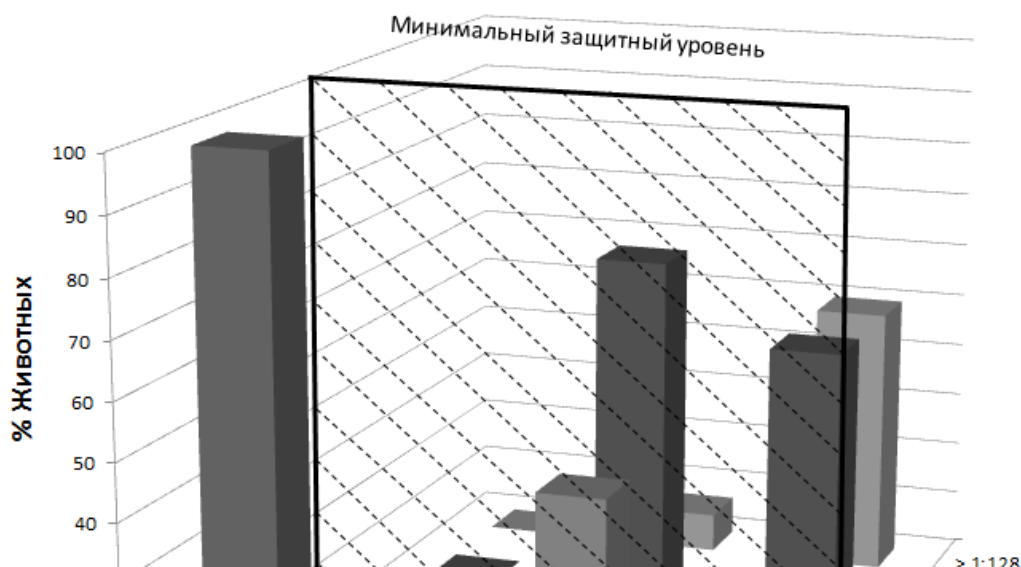


Рис.3. Соотношение животных с различным уровнем вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных до и после двукратной вакцинации.

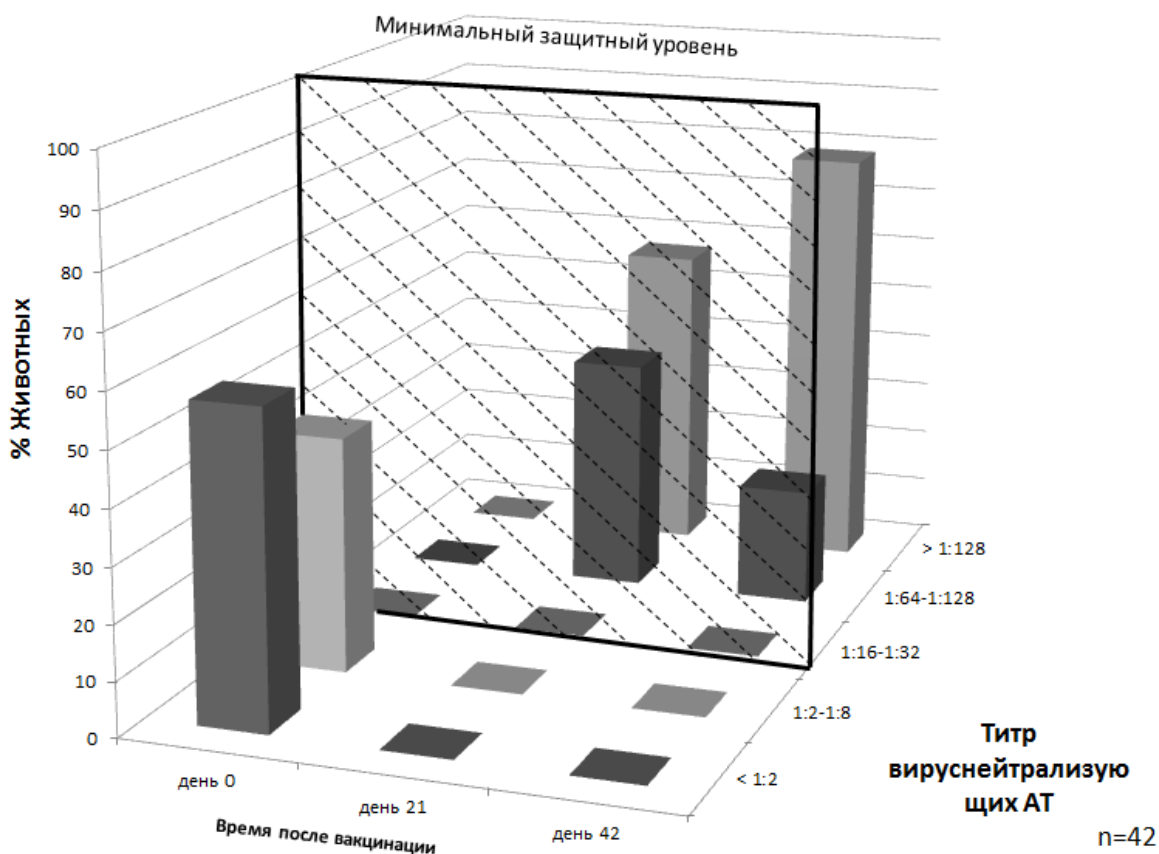


Рис. 4. Соотношение животных с различным уровнем вируснейтрализующих антител к аденовирусу собак 2-го типа до и после двукратной вакцинации.

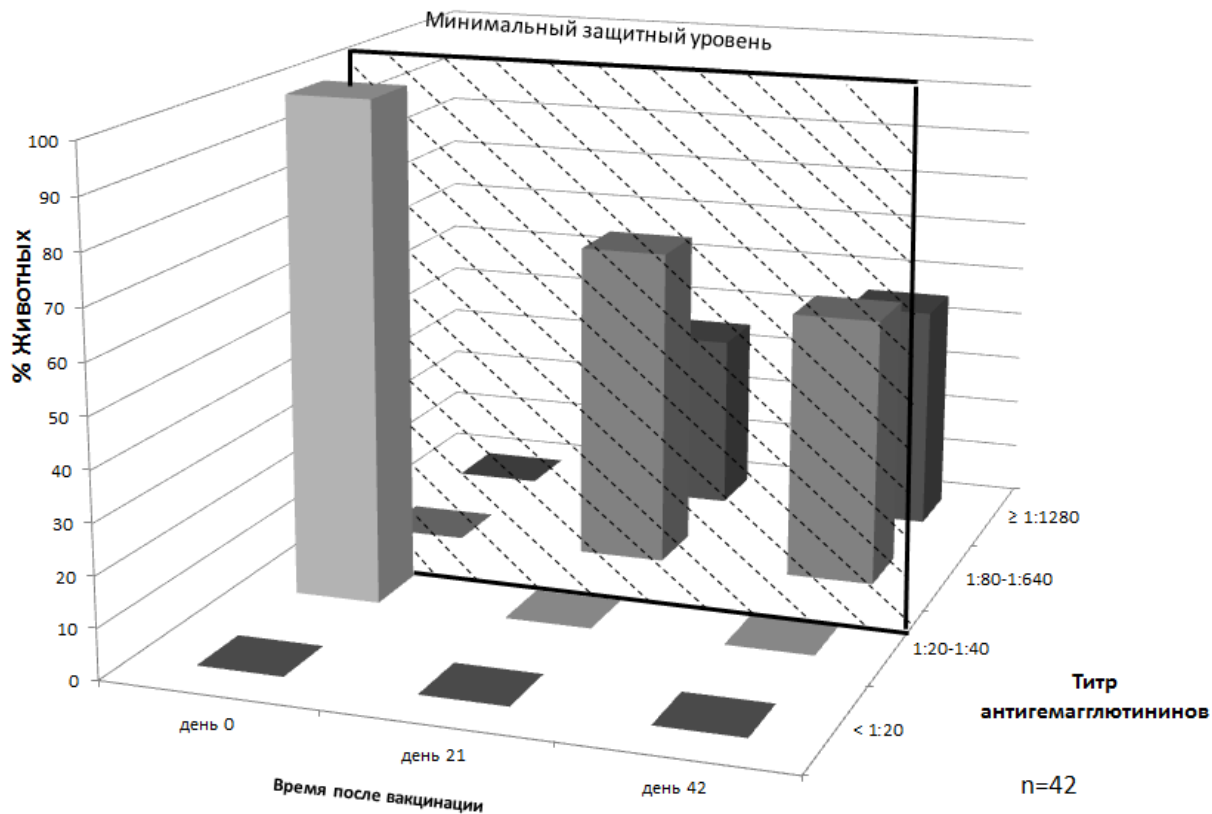
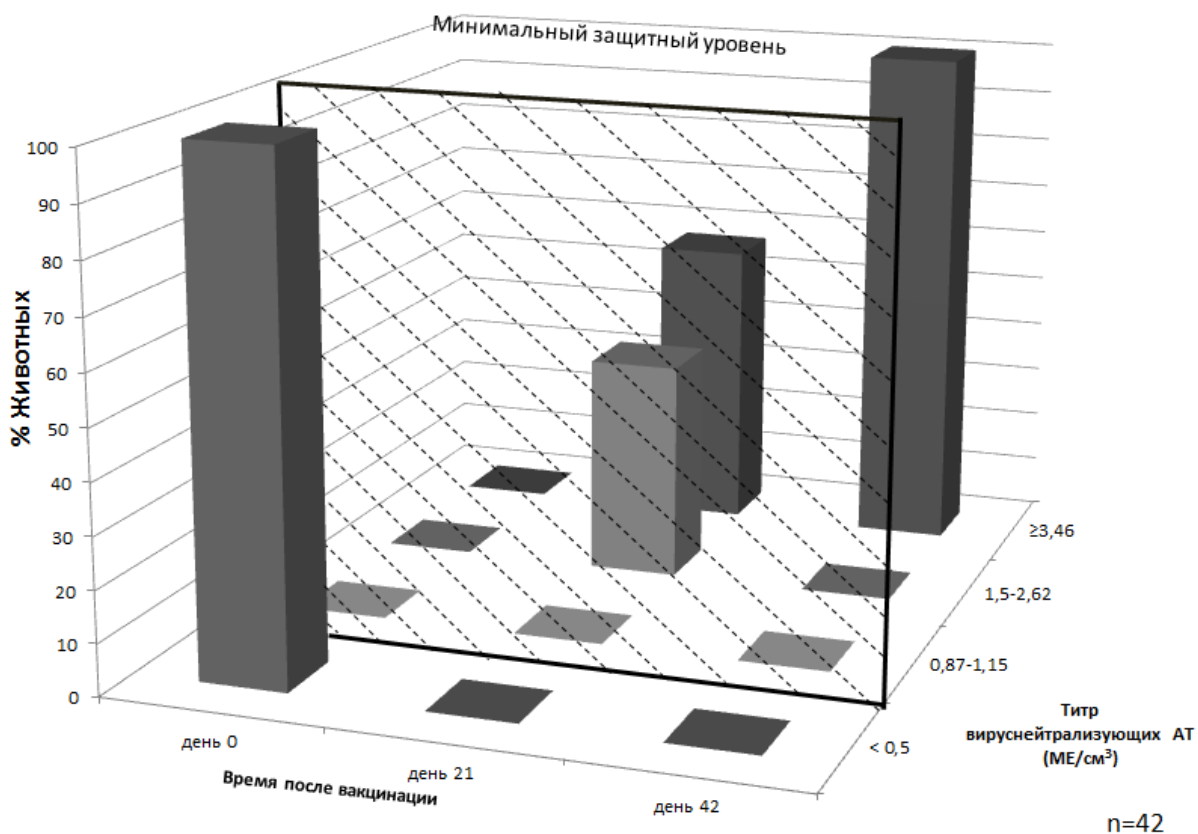


Рис. 5. Соотношение животных с различным уровнем антиагглютининов к парвовирусу собак до и после двукратной вакцинации вакциной Мультикан-8.





*Рис. 6. Соотношение животных с различным уровнем вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства до и после двукратной вакцинации.*