DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-6-13
УДК 619:615.371/372:636.8

Антигенная активность усовершенствованной вакцины "Мультикан-8" для песцов

Мухин А.Н.
Mukhin A.N.

Мухин А.Н., к.б.н., ст.н.с., amuhin@yahoo.com
Раев С.А., к.в.н., ст.н.с., raevsergey@mail.ru
Москвина А.С., к.б.н., ст.н.с., annamoskvina17@gmail.com
Лосич М.А., к.б.н., н.с., mkohnovich@rambler.ru
Верховский О.А., д.б.н., профессор, президент, info@dpri.ru

АНО "Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных", г. Москва.

Концевая Н.Н., к.в.н., зам. начальника ОКК, kontsevaya-n@mail.ru.

Селезнева Е.В., микробиолог ОКК, selja07@rambler.ru

Алипер Т.И., д.б.н., профессор, директор по науке и инновациям, aliper@narvac.com

ООО "Ветбиохим", г. Москва

Ключевые слова: Мультикан-8, вакцина, чума плотоядных, аденовирусные инфекции собак, парвовирусный энтерит собак, коронавирусный энтерит собак, лептоспироз, бешенство, антигенная активность, защитный уровень антител, адъювант, карбомер.

Резюме. Наиболее эффективным методом борьбы с инфекционными болезнями собак является профилактическая вакцинация. Применяемая с этой целью более 20 лет вакцина "Мультикан-8" содержит в качестве адъюванта гидроокись алюминия, которая индуцирует образование на месте введения безболезненной припухлости, что ограничивает возможность подкожного введения препарата. Использование в инактивированных вакцинах адъювантом на основе карбомеров (карбополов) позволяет вводить такие препараты подкожно, что благоприятно влияет на безопасность вакцин для животных. 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. В статье представлены результаты исследования антигенной активности вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак "Мультикан-8" с адъювантом на основе карбомера на 210 щенках песца 8–10 недель.

Antigenic activity of the improved variant of the vaccine "Multican-8" for grey foxes

Mukhin A.N.,

Raev S.A.,

Moskvina A.S.,

Losich M.A.,

Verkhovsky O.A.,

Independent Non-Profit Organization "Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases", Moscow.

Kontsevaya N.N.,

Selezneva E.V.,

"Vetbiochem ООО" (Limited Liability Company), Moscow.

Aliper T.I.,

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow.

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.

Abstract. Vaccination is a most effective approach for prevention of infectious diseases of dogs. Multican-8 is a hydroxide aluminum based vaccine, which are commercially available more than 20 years. The vaccine inducing the formation of painless swelling at injection site, which limit the possibility of subcutaneous injection. Applying of carbomer-type adjuvants in inactivated vaccines allow to inject that vaccines subcutaneously, which beneficially affected on safety of the animals vaccines.

Antigenic activity i.e. ability of vaccine to induce induction specific antibodies is a major criteria of the vaccine quality. Positive correlation between presence of virus-neutralising antibodies (in case of canine distemper virus, canine adenoviruses and rabies virus) and (or) haemagglutination inhibition antibodies (in case of canine parvovirus) and protection of animals after challenge is well known. 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 model of 8-10 week old grey fox puppies (n=210), kept at animal farm conditions. It was founded that double subcutaneous vaccine injection with 21 day interval induced production specific antibodies to canine distemper virus, canine adenoviruses, canine parvovirus and rabies virus with titer exceeding minimal protective level. Post vaccination virus-neutralizing antibodies titers for the canine distemper virus ranged 1:32-1:512, for the canine adenovirus-2 ranged 1:128-1:2048, while virus-neutralizing antibodies titers for rabies virus varied between 1,51 and 18,15 IU/cm³. Antihemagglutinine titer against CPV ranged 1:80-1:2560. Additionally, a significant seroconversion to canine coronavirus (the level of virus-neutralizing antibodies ranged 1:8-1:32), and 100% preventive activity of serum of vaccinated animals against all serologic groups of Leptospira, entering in vaccine formulation were found. Vaccine administration was not associated with any post-vaccinal complications among most of treated animals. Weakness and refusal of feed were observed only in 4 grey foxes 12-24 hrs. after the vaccination.

Для цитирования / For citation

Антигенная активность усовершенствованной вакцины "Мультикан-8" для песцов / Мухин А.Н. [и др.] //

Ветеринария и кормление. – 2019. – №6 – С. 48–51

Antigenic activity of the improved variant of the vaccine "Multican-8" for grey foxes / Mukhin A.N. [et. al.] //

Veterinaria i kormlenie. – М., 2019. – № 5 – Р.48–51

Рис.1. Средний геометрический титр антител к CDV, CAV-2, CCov (PH, log₂), CPV (PTGA, log₂) и вирусу бешенства (FAVN, ME/cm³) у песцов до и после двукратной вакцинации.

Fig. 1. Mean geometric titer of antibodies to CDV, CAV and CCov (VN, log₂), to CPV (HI, log₂) and to rabies virus (FAVN, IU/cm³) in grey foxes before and after double vaccination.

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

Fig.2. Preventive activity of grey foxes sera against Leptospira Canicola, Icterohaemorrhagiae and Grippotyphosa before and after double vaccination.

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

Fig. 3. The ratio of animals with different levels of virus-neutralizing antibodies to CDV before and after double vaccination.

ного возраста, содержащихся в условиях звероводческого хозяйства.

Установлено, что двукратное подкожное введение препарата с интервалом 21 день вызвало у всех животных выработку специфических антител к вирусу чумы, аденовирусу, парвовирусу собак и вирусу бешенства в титрах превышающих необходимый защитный уровень.

Уровень вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных после вакцинации составил 1:32–1:512, к аденовирусу собак 2-го типа 1:128–1:2048, а к вирусу бешенства 1,51–18,15 ME/cm³. Титр антигемагглютининов к парвовирусу собак составил 1:80–1:2560.

Отмечена выраженная сероконверсия к коронавирусу собак (уровень вируснейтрализующих антител был 1:8–1:32) и 100% превентивная активность сывороток крови вакцинированных животных в отношении лептоспир серологических групп, входящих в состав вакцины.

Ведение препарата не вызывало у большинства привитых животных поствакцинальных осложнений, лишь у 4-х песцов отметили вялость и отказ от корма в течение 12 – 24 ч после вакцинации.

Введение

Наиболее эффективным методом борьбы с инфекционными болезнями собак является профилактическая вакцинация [3,9,17].

В нашей стране более 20 лет применяется вакцина "Мультикан-8", содержащая живые аттенуированные штаммы вируса чумы плотоядных, аденовируса 2-го типа, парвовируса собак и инактивированные производственные штаммы вируса бешенства и лептоспир серогрупп Icterohaemorrhagiae, Canicola и Grippotyphosa, а также гидроокись алюминия в качестве адъюванта.

Препарат обладает выраженной антигенной и иммуногенной активностью и безопасен для собак, однако отсутствует возможность его подкожного применения в связи с содержанием гидроокиси алюминия, которая индуцирует образование на месте введения безболезненной припухлости [2].

В ветеринарной практике с успехом применяют инактивированные вакцины с адъювантом на основе карбомеров (карбополов) [5,6,7] – синтетических высокомолекулярных полимеров акриловой кислоты, сшитых аллиловым эфиром сахарозы или пентаэритрита. Их часто включают в состав косметических и фармацевтических средств, причем карбомеры с индексом "P" разрешено применять людям [11].

Для определения антигенной активности, как одного из наиболее важных критериев качества, вакцин для собак необходимо использование целевых животных. Эти исследования сталкиваются с этическими проблемами, связанными с использованием щенков и сложностью подбора экспериментальных групп достаточного объема. Использование для этих целей щенков песца, содержащихся в условиях звероводческого хозяйства, позволяет проводить исследования на достаточно объемных выборках, а эти животные являются хорошей моделью для исследования вакцин предназначенных для собак [2].

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

Материалы и методы

В работе использовали лиофилизированный компонент вакцины "Мультикан-8" серия №1 от 01.2018 г.

Жидкий компонент вакцины (растворитель) изготавливали путем смешивания осветленной центрифугированной культуральной жидкости, содержащей инактивированный вирус бешенства, концентрат лептоспир до конечной концентрации 6X10⁸ клеток/см³ и адъюванта (2% суспензия полимера акриловой кислоты (Corel Pharma Chem, Индия)) до конечной концентрации 10%. Контроль качества

полученного препарата осуществляли в соответствии СТО 76418883-1003-2011 ООО "Ветбиохим".

Иммуногенную активность изготовленного препарата в отношении вируса бешенства исследовали на белых мышах по методу НИН [19].

Антигенную активность вакцины исследовали на 210 клинически здоровых ранее не вакцинированных щенках песца обоих полов в возрасте 8–10 недель, содержащихся в условиях звероводческого хозяйства, которым дважды с интервалом 21 день подкожно в межлопаточную область вводили исследуемую вакцину в дозе 1 см³.

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 [1], к вирусу бешенства методом FAVN [19].

Превентивную активность сывороток вакцинированных животных в отношении лептоспир определяли на золотистых хомяках [4].

Результаты исследований и обсуждение

Предварительные исследования изготовленной вакцины показали ее полное соответствие по качественным показателям СТО 76418883-1003-2011 ООО "Ветбиохим".

Иммуногенная активность вакцины в отношении вируса бешенства (НИН) составила 1,6 МЕ.

Большинство животных сохраняло нормальные поведенческие реакции во время и после вакцинации. Только у 4-х песцов отметили вялость и отказ от корма в течение 12–24 ч после введения препарата. 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 песцов, представлены на рисунке 1. У песцов не было вируснейтрализующих (ВН) антител к вирусу чумы аденовирусам, коронавирусу собак и вирусу бешенства до вакцинации, а уровень антигемагглютининов к парвовирусу собак составил от <1:20 до 1:40. Введение вакцины стимулировало у животных синтез специфических антител, с увеличением их уровня после бустер-вакцинации.

Уровень ВН антител к вирусу чумы плотоядных после однократной вакцинации составил 3–7 log₂ (1:8–1:128) (ср. геом. 4,45 log₂), с увеличением до 5–9 log₂ (1:32–1:512) (ср. геом. 6,32 log₂) после второй инъекции препарата.

Титр ВН антител к аденовирусам собак после первого введения вакцины был 6–10 log₂ (1:64–1:512) (ср. геом. 8,26 log₂), а после второй инъекции увеличился до 7–11 log₂ (1:128–1:2048) (ср. геом. 8,62 log₂). Средний геометрический титр ВН антител к коронавирусу собак составил 3,22 log₂ и 4,85 log₂ после однократной и двукратной вакцинации соответственно. У всех животных после вакцинации выявляли нейтрализующие антитела к вирусу бешенства в титре, превышающем необходимые для защиты 0,5 МЕ/см³. После однократной вакцинации – 0,87–13,77 МЕ/см³ (ср. геом. 2,27 МЕ/см³), и 1,51–18,15 МЕ/см³ (ср. геом. 7,5 МЕ/см³) после двукратной.

До вакцинации 75% песцов имели специфические антитела к парвовирусу собак, на уровне 4,32 – 5,32 log₂ (1:20–1:40). После первой вакцинации он повысился у всех животных до 4,32 – 8,32 log₂ (1:20–1:320) (ср. геом. титр 6,25 log₂). Повторная вакцинация привела к его дальнейшему увеличению до 6,32 – 11,32 log₂ (1:80–1:2560) (ср. геом. титр 8,29 log₂).

До вакцинации превентивная активность сывороток крови песцов в отношении лептоспир серогрупп Icterohaemorrhagiae и Grippotyphosa была 10% (средняя по группе), а в отношении лептоспир серогруппы Canicola отсутствовала. Сыворотки крови песцов, взятые через 21 день

Рис. 4. Соотношение животных с различным уровнем вируснейтрализующих антител к CAV-2 до и после двукратной вакцинации.

Fig.4. The ratio of animals with different levels of virus-neutralizing antibodies to CAV-2 before and after double vaccination.

Рис. 5. Соотношение животных с различным уровнем антиагглютининов к CPV до и после двукратной вакцинации.

Fig.5. The ratio of animals with different levels of anti-hemagglutinins to CPV before and after double vaccination.

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

Fig.6. The ratio of animals with different levels of virus-neutralizing antibodies to rabies virus before and after double vaccination.

после первой вакцинации, в среднем защищали 60% хомяков при заражении лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae* и 80% и 70% животных при заражении лептоспирами серогрупп *Gryppotyphosa* и *Canicola* соответственно (рис.2).

Сыворотки крови песцов, взятые после двукратной вакцинации, обладали 100% превентивной активностью в отношении лептоспир всех 3-х серогрупп.

Уже первое введение вакцины позволило защитить песцов от чумы плотоядных – 90% животных имели протективный уровень антител 1:16 – >1:128, у 10% животных титр антител составил 1:2-1:8, что не всегда достаточно для надежной защиты. Повторная вакцинация увеличила до 100% количество животных с уровнем антител, превышающим защитный, причем 25,7% животных имели титр 1:64-1:128, а 41,4 % более чем 1:128 (рис.3).

Однократная вакцинация стимулировала у всех песцов защиту от аденовирусных инфекций (рис.4) – у 86,6 % животных титр антител стал более чем 1:128, а после бустер-вакцинации таких животных стало 91,7%, причем у оставшихся титр ВН антител к аденовирусу собак составил 1:64-1:128, что значительно превосходит протективный уровень.

После первой иммунизации уровень антигемагглютининов к парвовирусу собак у 48,3 % животных стал 1:20 - 1:40, у 43,4% - 1:80 -1:160, у 8,3 % песцов – 1:320 -1:640. При этом не осталось животных с уровнем антител меньшим 1:20 (рис.5).

Известно, что наличие материнских антител к парвовирусу собак у щенков перед вакцинацией значительно влияет на эффективность вакцинации последних от парвовирусного энтерита. У 75 % песцов до вакцинации были антитела к парвовирусу собак в титре 1:20-1:40. В связи с чем, около половины животных имели только минимальный защитный уровень антител (1:20-1:40) после первой вакцинации. После второго введения вакцины титры антигемагглютининов 1:80-1:160 отмечены у 26,7% песцов, 1:320-1:640 у 61,6%, а у 11,7 % животных титр антител превысил 1:1280.

Все животные были защищены от бешенства уже после однократной вакцинации: 11,4% животных имели антитела в титре 0,87– 1,15 МЕ/см³, 65,7% – 1,5–2,62МЕ/см³, а у 22,9 % песцов уровень антител превысил 3,46 МЕ/см³. После бустер-иммунизации у 87,1% животных титр антирабических антител превысил 3,46 МЕ/см³, а у 12,9% составил 1,5–2,62МЕ/см³ (рис.6).

Многочисленными исследованиями показана положительная корреляция между титром выявляемых в реакциях нейтрализации (РН) или (и) торможения геагглютинации (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) [8,9,15,17,18].

Метод FAVN является общепринятой методикой по определению протективного уровня вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства. Установлено, что животные с уровнем антител 0,5 МЕ/см³ и выше надежно защищены при контакте с вирусом бешенства [19].

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 [10,12,16]. При отсутствии корреляции между наличием

специфических антител к лептоспирам и защитой при контрольном заражении [13,14], более информативным является исследование превентивной активности сывороток крови вакцинированных собак для золотистых хомяков.

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 серебристого песца образование специфических антител к возбудителям чумы плотоядных, парво- и коронавирусного энтеритов, аденовирусных инфекций и бешенства. Сыворотки крови вакцинированных песцов обладали 100% превентивной активностью в отношении лептоспир серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Gryppotyphosa* 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. Львов Д.К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Медицинское информационное агентство. Москва, 2013.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Мухин А.Н. и др. "Леоминор" - новая вакцина против вирусной лейкемии кошек, Труды Московского Международного ветеринарного конгресса. 2009; 6, 7.
 7. Раев С.А. и др. Разработка и применение вакцины "ВЕРРЕС-ЦИРКО". Ветеринария сегодня. 2013; 3(6):54 - 59.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Decaro N. et al. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; 11:102-105.
 11. EUROPEAN PHARMACOPOEIA - 8th EDITION. 2013; 1766 - 1768.
 12. Greene C.E. et al. Canine viral enteritis // In: Infectious diseases of the dog and cat, 4th ed., Elsevier, 2012; p. 67-80.
 13. Klaasen H.L. et al. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. Veterinary Microbiology. 2003; 95, 121-132.
 14. Martin L.E.R. et al. Vaccine-associated Leptospira antibodies in client-owned dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2014; 28, 789-792.
 15. 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.
 16. Pratelli A. et al. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs. Vet. Microbiol. 2004; 99,43-49.
 17. Schultz R. D. Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review. Veterinary Microbiology. 2006; 117:75 - 79.
 18. Schultz R. D. et al. Age and Long-term Protective Immunity in Dogs and Cats. J. Comp. Path. 2010; 142:102 - 108.
 19. World Organization of Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018; <http://www.oie.int/>
- ### References
1. Belousova R.V. et al. Veterinary Virology: Methods. Moskva. 2006.
 2. Aliper T.I. et al. Diagnosis and prevention of infectious diseases of cats and dogs: A guide for practicing veterinarians. Moskva. 2017, 207 - 212.
 3. L'vov D.K. et al. Virology Guide. Viruses and viral infections of humans and animals. Medicinskoe informacionnoe agentstvo. Moskva, 2013.
 4. Malahov Y.A. et al. Method for testing of duration of anti-leptospirosis immunity in farm animals. Materialy 6-j Vsesoyuznoj nauchnoj konferencii po leptospirozu. Baku, 1975, 208-210.
 5. Mukhin A.N. et al. Antigenic activity of the improved variant of the vaccine "Multifel-4" against panleukopenia, infectious rhinotracheitis, calicivirus infection and chlamydia of cats. Veterinariya. 2018, 9:22-27.
 6. Mukhin A.N. et al. "Leominor" - a new vaccine against feline viral leukemia. Trudy Moskovskogo Mezhdunarodnogo veterinarnogo kongressa. 2009, 6-7.
 7. Raev S.A. et al. Development and use of the "VERRES-CIRCO" vaccine. Veterinariya segodnya. 2013, 3:54-59.
 - 8-19. Vide supra.