

ISSN 1817-7204(Print)

ISSN 1817-7239(Online)

УДК [619:616.98:578.824.11-085.371]:639.113.1(476)

<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-3-334-343>

Поступила в редакцию 19.02.2019

Received 19.02.2019

**Д. В. Бучукури, Н. А. Ковалев, Ю. В. Ломако, Д. С. Борисовец,
С. В. Великий, Д. О. Шпилевский**

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого,
Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь*

ВАКЦИНОСОДЕРЖАЩАЯ БЕЗБЛИСТЕРНАЯ ПРИМАНКА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

Аннотация: Бешенство – абсолютно смертельное острое вирусное заболевание, поражающее человека и всех теплокровных животных, которое распространено во многих странах мира, в том числе и в Беларуси. Основным источником заражения вирусом бешенства являются дикие плотоядные животные, главным образом лисицы, поэтому разработка и усовершенствование средств и методов профилактики указанного заболевания среди диких плотоядных животных, в частности пероральной иммунизации плотоядных животных, имеет важное научно-практическое значение. Сконструирована антирабическая вакцина для перорального применения в форме безблистерной приманки, состоящей из селекционированного нами фиксированного вируса бешенства – штамм КМИЭВ-94 (71БелНИИЭВ–ВГНКИ М), мясокостной и пшеничной муки, желатина, глицерина и тетрациклина. Разработана технология изготовления усовершенствованной высокоиммуногенной безблистерной вакциносодержащей приманки для пероральной вакцинации диких плотоядных животных против бешенства. Изучены иммунологическая и противозооэпизоотическая эффективности вакциносодержащих приманок. Установлено, что применение разработанной вакциносодержащей безблистерной антирабической приманки в природных условиях экологически безопасно, так как входящий в ее состав вирус бешенства «КМИЭВ-94» является глубоко аттенуированным, апатогенным для мышевидных грызунов и плотоядных животных при пероральном введении, не обладает реверсильностью и через 9 дней хранения приманки при температуре плюс 18–20 °С инактивируется. Высокая эффективность, безвредность простота технологии изготовления разработанной приманки свидетельствуют о перспективности ее внедрения в практику, что позволит снизить заболеваемость животных бешенством.

Ключевые слова: бешенство, антирабическая вакцина, пероральная иммунизация, дикие плотоядные животные, безблистерная вакциносодержащая приманка, штамм вируса КМИЭВ-94 антирабическая вакцина, безблистерная приманка

Для цитирования: Вакциносодержащая безблистерная приманка для пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства / Д. В. Бучукури, Н. А. Ковалев, Ю. В. Ломако, Д. С. Борисовец, С. В. Великий, Д. О. Шпилевский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2019. – Т. 57, № 3. – С. 334–343. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-3-334-343>

D. V. Buchukuri, N. A. Kovalev, Y. V. Lamaka, D. S. Barysavets, S. V. Velikiy, D. O. Shpilevskiy

S.N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine, the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

VACCINE-CONTAINING BLISTER-FREE BAIT FOR ORAL IMMUNIZATION OF CARNIVOROUS ANIMALS AGAINST RABIES

Abstract: Rabies is absolutely lethal acute viral disease that affects humans and all warm-blood animals, which is common in many countries of the world, including Belarus. Wild carnivorous animals, mainly foxes, are the main source of rabies virus infection, therefore development and improvement of means and methods for preventing this disease among wild carnivores, in particular oral immunization of carnivorous animals, is of great research and practical importance. Anti-rabies vaccine was developed for oral use in the form of a blister-free bait consisting of fixed rabies virus selected by us – strain KMIEV-94 (71 BelNIIEV–VGNKI M), meat and bone meal and wheat flour, gelatin, glycerin and tetracycline. Technology for manufacture of improved highly immunogenic blister-free vaccine-containing bait for oral vaccination of wild carnivorous animals against rabies was developed. Immunological and anti-epizootic efficiency of vaccine-containing baits was studied. It was determined that use of the developed vaccine-containing blister-free anti-rabies bait in natural conditions is ecologically safe, since KMIEV-94 rabies virus is deeply attenuated and apathogenic for rodents and carnivorous animals after oral administration, does not have reversibility and after 9 days of storing the bait at a temperature of 18–20 °C is inactivated. High efficiency, safety, simple manufacturing technology of the developed bait indicate prospects of its introduction into practice, which will reduce the incidence of rabies in animals.

Keywords: rabies, anti-rabies vaccine, oral immunization, wild carnivores, blister-free vaccine-containing bait, KMI-EV-94 virus strain, blister-free bait

For citation: Buchukuri D. V., Kovalev N. A., Lamaka Y. V., Barysavets D. S., Velikiy S. V., Shpiylevskiy D. O. Vaccine-containing blister-free bait for oral immunization of carnivorous animals against rabies. *Vestsi Natsyyanal'nyay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2019, vol. 57, no 3, pp. 334-343 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2019-57-3-334-343>

Введение. Бешенство – абсолютно смертельное острое вирусное заболевание, поражающее человека и всех теплокровных животных, которое распространено во многих странах мира, в том числе и в Беларуси. По данным ВОЗ и МЭБ, ежегодно от бешенства в мире погибают от 55 до 59 тыс. человек и более 1 млн животных [1, 2].

По своей социально-экономической значимости оно занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии, поэтому изучению бешенства, разработке мер профилактики и борьбы с ним уделяется исключительно большое внимание. Специфические методы лечения при данном заболевании отсутствуют, одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация.

Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Луи Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством, однако она имела существенные недостатки, что побуждало исследователей на поиски новых путей совершенствования препарата. За прошедшие годы появилось много различных модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства: с одной стороны – путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцин при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) для культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности входящего в состав вакцины вируса [3–6].

В Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского в результате многолетних исследований впервые в СССР и Беларуси были селекционированы культуральный вакцинный вирус бешенства – штамм 71 БелНИЭВ-ВГНКИ и более биологически активный штамм КМИЭВ-94 (БелНИЭВ-ВГНКИ М), сконструированы и внедрены в производство антирабические вакцины «БЕЛРАБ» и «РАБИРИФ» для парентерального применения домашним животным¹.

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 около 72 % всех случаев заболевания [7]. Следовательно, наиболее эффективным способом борьбы с бешенством становится ликвидация очагов инфекции в популяции 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 км². Однако проводимые мероприятия, направленные на снижение численности лисиц, дают лишь временный эффект и не решают проблему, о чем свидетельствует опыт ряда европейских стран [8, 9]. Кроме того, эти мероприятия могут нарушить экологическое равновесие в природе и привести к отрицательным последствиям. Поэтому на основу профилактики бешенства среди диких плотоядных в настоящее время наряду со снижением их численности применяется пероральная вакцинация, которая технически осуществима в природных условиях. Для изготовления аттенуированных вакцин перорального применения в различных странах используют ряд аттенуированных, модифицированных

¹ Штамм «Rabies fix-71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» №29 для приготовления вакцины против бешенства : а. с. ВУ 1091393 / Н. А. Ковалев [и др.] ; Аттенуированный штамм вируса бешенства Rabies fix КМИЭВ-94 – штамм-антиген, вакцина культуральная на его основе для пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства и способ получения вакцины : пат. ВУ13935 / Д. В. Бучукури, Н. А. Ковалев, А. А. Гусев, М. М. Усеня, П. А. Красочко, Т. А. Савельева, Т. Н. Буркун. Оpubл. 30.12.2010; Способ изготовления антирабической инактивированной вакцины для сельскохозяйственных животных : пат. RU 2244557 / В. И. Жестерев, Т. Ф. Горшкова, О. Г. Лаптева, В. И. Бальшева, Е. М. Хрипунов, Н. А. Ковалев, М. М. Усеня. Оpubл. 20.01.2005; Инактивированная вакцина для профилактики бешенства у животного : пат. ВУ 12751 / Н. А. Ковалев, П. И. Уласович, М. М. Усеня, Д. В. Бучукури. Оpubл. 30.12.2009

штаммов и генноинженерных рекомбинантов: PV Paris, SAD, SAD B, SAD B19, SAD P5/88, SAG1, SAG2, Внуково 32, ТС-80, РВ-97, VRG, ERA G333, Flury Нер и др. [10–17].

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского в 1980-х годах для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства предложил вакцину из штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ», которая в практических условиях показала удовлетворительную эффективность. В дальнейшем 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.

Производство вакциносодержащих приманок налажено в Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского и ОАО «БелВитунифарм». Применение указанных приманок в ряде республик СССР и стран СНГ (Беларуси, России, Украине, Литве, Грузии) оказалось эффективным и способствовало в обработанных регионах снижению заболеваемости животных бешенством² [18–20].

Однако производимые в настоящее время в Беларуси и в других странах вакциносодержащие антирабические приманки имеют ряд недостатков. Нуждается в улучшении состав приманок, привлекательность их для плотоядных животных, технология изготовления. Недостаточная прочность консистенции приманок затрудняет применение их с помощью авиации, а состав не всегда привлекает животных. При поедании приманок плотоядные животные в 50 % случаев и более не раскусывают содержащийся в них плотный блистер с вакциной, а выплевывают его, поэтому у отстреленных животных часто обнаруживают только тетрациклиновую метку, а вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови отсутствуют. Все это снижает противоэпизоотическую эффективность перорального способа вакцинации диких животных против бешенства с помощью существующих вакциносодержащих приманок.

Цель работы – сконструировать и разработать технологию изготовления усовершенствованной высокоиммуногенной безблистерной вакциносодержащей приманки для пероральной вакцинации диких плотоядных животных против бешенства.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили в отделе вирусных инфекций, виварии Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, виварии Витебской государственной академии ветеринарной медицины и в Молодечненском районе Минской области в 2016–2018 гг.

Подопытные животные. В исследовании использованы белые мыши и собаки. Нелинейных белых мышей массой 6–8 г получали из питомника Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, собак различных пород массой 10–15 кг – из вивария Витебской государственной академии ветеринарной медицины.

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 ВНК-21, Vero, ПС. Фиксированный вирус бешенства (штамм «CVS») получен из лаборатории профилактики бешенства Института полимиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

Биопрепараты. Для исследований на бешенство мозга животных, а также для титрации вируса бешенства и определения титров антирабических антител в RFFIT использовали антирабический гамма-глобулин «Bio-Rad» (Франция) и флюоресцирующий антирабический гамма-глобулин (Россия).

Культуры клеток. Для культивирования фиксированных вирусов бешенства использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/13 и питательную среду ИГЛА МЕМ.

Фармпрепараты и компоненты. Для приготовления приманок использовали тетрациклин гидрохлорид, муку мясокостную (ГОСТ 17536–82), муку пшеничную, глицерин, желатин.

² Вакцина для пероральной иммунизации плотоядных животных против бешенства и способ приготовления вакцины : а. с. 1120701 СССР / Н. А. Ковалев, Т. Л. Сорокина, Э. В. Ивановский, Д. Ф. Осидзе, А. С. Шашенько, В. П. Давыденко. Заявл. 22.06.1984.

Титрация вируса бешенства и определение титра вируснейтрализующих антител. Титрацию вируса бешенства проводили на белых мышах и на культуре клеток методом RFFIT, определение титра вируснейтрализующих антител – в РН на белых мышах³.

Получение вирусного сырья для изготовления вакцины осуществляли реакторным и роллерным способами.

Определение контаминации вируса бактериями и грибами. Для проверки вирусосодержащей жидкости на контаминацию бактериями и грибами отобранные пробы высевали в пробирки с МПА, агаром Сабуро – по 0,5 мл, во флаконы с МПБ и МППБ под вазелиновым маслом – по 1 см³. Питательные среды с посевами выдерживали в течение 10 дней, а с пересевами – в течение 7 дней при температуре 37±0,5 °С (для агара Сабуро – от 20 до 24 °С). Все посеvy вирусосодержащей жидкости были стерильными.

Схема исследования:

- 1) отработка эффективного способа репродукции вакцинного вируса бешенства;
- 2) конструирование рациональной вакциносодержащей приманки;
- 3) изучение иммунологической и пртивоэпизоотической эффективности вакциносодержащих приманок.

Результаты и их обсуждение

1. Отработка эффективного способа репродукции вакцинного вируса бешенства. Первоначально был отработан эффективный способ суспензионного культивирования культуры клеток ВНК-21/13 со средой Игла МЕМ. Оптимальными параметрами культивирования были: температура культивирования – 36,6–37,0 °С; скорость перемешивания клеток в зависимости от типа реактора, объема заполнения и типа мешалки – 55–65 и 70–140 об/мин; режим аэрации в биореакторах барботажного типа – 2,5–30 и 7,5–75 л/ч спустя 2 ч после загрузки клеток; показатель концентрации водородных ионов среды – рН 6,9–7,4 (регулировали 7,5%-ным раствором бикарбоната натрия). Исходная посевная концентрация клеток составляла 500–700 кл/мл.

Динамика накопления зараженных клеток сохранялась в логарифмической фазе до 48–63 ч, после чего интенсивность их размножения снижалась. При оптимальном соотношении клеток ВНК-21/13 и вируса бешенства в биореакторе максимальное накопление вируса происходило через 72 ч при падении процента живых клеток до 85–90 и увеличении их концентрации до 2,1–2,5 млн/мл.

Промышленное культивирование клеток ВНК-21/13 и вакцинного вируса бешенства – штамма «КМИЭВ-94» – проводили в биореакторе «BioFlo-5000» (США). Данный реактор с рабочим объемом 90 л позволяет культивировать культуру клеток ВНК 21/13 без смены среды в течение 72–94 ч. Оптимальная посевная концентрация клеток составляла 700–1000 тыс/мл, а конечная – 2,1–2,6 млн/мл. Сохранение живых клеток достигало 90–98 %. В качестве питательной среды использовали Игла МЕМ с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота. Подача очищенного воздуха, питательной среды и поддержание уровня рН 7,2 осуществлялась после настройки в автоматическом режиме. Температура жидкости составляла 37±0,5 °С.

Начальное накопление культуры клеток ВНК-21/13 производили на среде Игла МЕМ в роллерных установках, затем клетки вносили в биореактор.

Интенсивность размножения клеток в динамике контролировали на 2, 3 и 4-е сутки путем отбора проб и проверки их концентрации, состояния структуры, стерильности и контаминации микрофлорой.

³ Laboratory techniques in rabies / ed.: F. X. Meslin, M. M. Kaplan, H. Koprowski. Geneva : World Health Organization, 1996. 476 p.; Изучение иммуногенной активности жидкой культуральной инактивированной сорбированной антирабической вакцины / П. И. Уласович, Н. А. Ковалев, Д. В. Бучукури, М. М. Усеня // Ветеринарная наука – производству : науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ветеринарии им. С. Н. Вышелесского НАН Беларуси. Минск, 2005. Вып. 37. С. 158–163; Laboratory techniques in rabies / ed.: F. X. Meslin, M. M. Kaplan, H. Koprowski. Geneva : World Health Organization, 1996. 476 p.; Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses) [Electronic resource] // Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018 : OIE teristerial manual 2018 / World Organisation for Animal Health. OIE, 2018. Chap. 3.1.17. Mode of access: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf. Date of access: 02.02.2019.

С целью репродукции вакцинного вируса бешенства в клетках ВНК-21/13 в биореактор одновременно с клетками вносили вирус – штамм «КМИЭВ-94» в количестве 0,6–0,14 ТКИД₅₀/кл.

Через 2, 3 и 4 сут культивирования при 37 °С при постоянном перемешивании и поддержании рН 7,2–7,4 вирусосодержащую суспензию проверяли на бактериальную контаминацию и титровали на белых мышах или на культуре клеток. Исследования проводили в течение трех последовательных пассажей. Параллельно культивировали вакцинный штамм вируса на культуре клеток ВНК-21/13 на роллерной установке Wheaton science products 349005-С.

Технология промышленного культивирования клеток ВНК-21 и вакцинного вируса бешенства (штамм «КМИЭВ-94») на роллерной установке заключалась в следующем. В питательную среду с клетками в количестве 0,1–1,2 млн/мл, разлитую в роллерных флаконах по 200,0 см³, вносили вирус в количестве 0,1–0,6 МLD₅₀/кл. Температура питательной среды составляла 37±0,5 °С, скорость вращения флаконов – от 12 до 28 об/мин. Сбор урожая проводили на 3–4-е сутки. Конечный слив вирусосодержащей суспензии проверяли на стерильность и титр вируса.

Наибольшее накопление вакцинного вируса бешенства происходило на культуре клеток ВНК-21/13 при реакторном способе культивирования (титр 7,0±0,2 lg MICLD₅₀/мл).

При роллерном способе культивирования титр был ниже (6,8±0,25) lg MICLD₅₀/мл. Самое низкое накопление вируса происходило при культивировании в матрасах (6,7±0,25) lg MICLD₅₀/мл. Существенной разницы в титрах вируса через 3 и 4 сут культивирования не выявлено.

2. Конструирование рациональной вакциносодержащей приманки. Для конструирования приманки использовали мясокостную и пшеничную муку, в которую добавляли тетрациклина гидрохлорид, глицерин, желатин в виде теплого 12%-ного водного раствора и культуральный вирус бешенства, охлажденный до 2–4 °С.

Приманки готовили следующим образом. Мясокостную и пшеничную муку тщательно перемешивали. Желатин растворяли в горячей воде и добавляли туда глицерин, раствор вносили в смесь мясокостной и пшеничной муки, тщательно перемешивали и охлаждали до плюс 4 °С. В полученную массу вносили вакцинный вирус с титром 7,0 lg MICLD₅₀/мл, добавляли тетрациклин (метка для учета поедаемости животными приманок) и после тщательного перемешивания, приманочную массу укладывали в круглые пластиковые формы, диаметром 5 см, и готовили приманки массой 20–30 г, которые сразу замораживали при температуре минус 18–20 °С. Из 1 кг приманочной массы получали приблизительно 35–40 вакциносодержащих приманок плотной консистенции.

Было испытано 4 состава вирусосодержащих безблистерных приманок с различным соотношением компонентов, которые приведены в табл. 1.

Приготовленные 4 образца приманок хранили при температуре минус 18–20 °С, плюс 4 °С и плюс 25 °С при обычной влажности и во влажной камере при плюс 4–6 °С в течение 5 и 30 дней. В период наблюдения не все приманки сохранили первоначальную форму и консистенцию. В частности, образцы приманки № 1, № 2 и № 3 при температуре плюс 25 °С и температуре

Т а б л и ц а 1. Состав и соотношение компонентов приманочной массы для изготовления 30 вакциносодержащих приманок весом 25–30 г

T a b l e 1. Composition and ratio of components of bait mass for production of 30 vaccine-containing baits of 25-30 g of weight

Ингредиент	Образцы приманок			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Мясокостная мука, г	200	180	200	250
Пшеничная мука, г	210	200	175	150
Желатин, г	65	55	40	30
Вода, см ³	80	90	120	100
Глицерин, мл	20	50	40	45
Тетрациклин, г	5	5	5	5
Вирусосодержащая жидкость, см ³	100	100	100	100
Итого, г	680	680	680	680

плюс 4–6 °С во влажной камере через 7 дней стали мягкими. Наиболее устойчивым оказался образец приманки №4.

Поедаемость приманок проверяли путем скармливания 10 собакам, ударопрочность – путем сбрасывания с высоты 15–30 м. Приманка образца №4 хорошо поедалась собаками и после сбрасывания на земляную поверхность оставалась не расколотой, что свидетельствует о возможности распространения их с движущегося наземного и авиатранспорта.

Для разработки способа индикации вакцинного вируса из размороженных приманок готовили суспензию на охлажденном до 2–4 °С физрастворе в соотношении 1:2 и центрифугировали в охлажденном роторе при 4 тыс. об/мин в течение 30 мин. Надсадочную жидкость сливали стерильно, добавляли туда антибиотики (пенициллин – 100 ед/мл и стрептомицин – 100 мг/мл), выдерживали в течение 4 ч при плюс 4–8 °С и титровали на белых мышах по общепринятой методике.

Для определения сохранности вакцинного вируса бешенства в приманках при различных температурах их хранили при температурах плюс 2–8 °С, плюс 18–20 °С и минус 20 °С. Через 3, 5 и 9 сут в них определяли титр вируса по вышеуказанной методике (табл. 2).

В результате при исходном титре вируса в приманках 4,0 lg MICLD₅₀/мл через 3, 5 и 9 сут хранения в холодильнике (+ 2–8 °С) и в морозильнике (– 20 °С) данный показатель практический не изменился. При хранении в условиях температуры плюс 18–20 °С через 3–5 сут титр вируса снизился на 0,5–1,5 lg MICLD₅₀/мл, а через 9 сут – полностью инактивировался (табл. 2), при этом во все сроки хранения цвет, запах, консистенция и форма приманок не изменялись.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования вирусосодержащих антирабических приманок в данные сроки при указанных температурах в природных условиях.

Для определения поедаемости и безвредности сконструированных приманок был поставлен опыт на 6 собаках. После суточного голодания 3 собакам было скармлено по 5 приманок и 3 собакам – по 10. За животными вели наблюдение в течение 30 дней. В результате поедаемость приманок составила 100 %. Все животные в течение срока наблюдения оставались живы и каких-либо отклонений от нормы не имели, что свидетельствует о хорошей привлекательности и безвредности приманок для плотоядных животных.

3. Иммунологическая и противоэпизоотическая эффективности вакциносодержащих приманок. Напряженность индуцируемого иммунитета после скармливания приманок изучали в опыте на 9 серонегативных собаках. Трём собакам после суточного голодания было скармлено по одной приманке, трём – по две приманки. Три собаки, не получившие приманки, служили контролем. Через 21 день после скармливания приманок от животных были получены сыворотки крови и исследованы на наличие вируснейтрализующих антирабических антител в реакции нейтрализации на белых мышах (табл. 3).

Как видно из табл. 3, средний титр вируснейтрализующих антител у животных, получивших по 1 приманке с вакциной, составил 6,6 log₂, а у животных, получивших по 2 приманки, – 8,7 log₂. Антитела в таких титрах защищают животных от заражения уличным

Таблица 2. Титр вируса бешенства в приманках (lg MICLD₅₀/мл) при различных температурах и продолжительности хранения

Table 2. Rabies virus titer in bait (lg MICLD₅₀/ml) at different temperatures and storage period

Срок хранения вакциносодержащих приманок, сут	Температура хранения, °С		
	– 20	+ 2–8	+ 18–20
0	4,0	4,0	4,0
3	4,0	4,0	3,5
5	4,0	4,0	2,5
9	4,0	3,0	–

Таблица 3. Титр вируснейтрализующих антирабических антител у собак через 21 день после пероральной иммунизации

Table 3. Titer of neutralizing anti-rabies antibodies in dogs 21 days after oral immunization

Вариант опыта	Количество животных в группе	Количество скармленных приманок	Титр вируснейтрализующих антител, log ₂
Опытная группа I	3	1	6,0
			6,0
			8,0
			Средний титр 6,6
Опытная группа II	3	2	9,0
			9,0
			8,0
			Средний титр 8,7
Контрольная группа	3	0	0
			0
			0

вирусом бешенства. У контрольных животных антирабические вируснейтрализующие антитела отсутствовали [8, 20].

Для изучения иммунологической и противоэпизоотической эффективности вакциносодержащих безблистерных антирабических приманок в природных условиях по вышеописанной технологии приготовили опытную партию 400 вирусосодержащих приманок, которые проверили на содержание вакцинного вируса (титр $4,0 \pm 0,1 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{мл}$), поедаемость и безвредность на 8 собаках (100 %) и иммуногенность на 8 собаках (титр антител через 21 день после скармливания – $6,0\text{--}8,7 \log_2$).

Для изготовления опытной партии приманок брали 2,5 кг мясокостной, 1,5 кг пшеничной муки и тщательно перемешивали. Затем 300 г желатина растворяли в 1000,0 см³ горячей воды и добавляли туда 450 см³ глицерина, приготовленный раствор вносили в смесь мясокостной и пшеничной муки, тщательно перемешивали и охлаждали до плюс 2–4 °С. В полученную массу вносили 1000 см³ вакцинного вируса бешенства с титром $6,5 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{мл}$, добавляли 50,0 г тетрациклина и после тщательного перемешивания готовили приманки массой 20–30 г, которые сразу замораживали при температуре минус 18–20 °С.

Испытание опытной партии сконструированной антирабической пероральной вакцины для плотоядных животных в природных условиях было проведено в угрожаемых и неблагополучных по бешенству диких животных урочища Молодечненского района Минской области общей площадью 20 км². Для этой цели были привлечены работники местной ветеринарной службы.

Приманки в количестве 400 шт. были ручным способом разбросаны в неблагополучных урочищах из расчета 20–25 приманок на км². Учет результатов производился по поедаемости приманок (через 5–7 сут) и по отсутствию заболеваемости животных бешенством через 3 мес. Кроме того, через 1–3 мес в урочищах отстреляли 4 лисиц и определили у них тетрациклиновую метку в зубах и уровень вируснейтрализующих антител в крови.

В результате случаев заболевания диких животных и мышевидных грызунов бешенством на вакцинированной территории не отмечено, а поедаемость приманок составила около 60 %. В шлифах зубов всех отстрелянных лисиц выявлена тетрациклиновая метка, а в сыворотке крови обнаружены вируснейтрализующие антитела в титре $5,6\text{--}5,8 \log_2$.

Полученные данные свидетельствуют о хорошей поедаемости сконструированных приманок дикими плотоядными животными и способности их индуцировать у животных напряженный иммунитет против бешенства.

Особо следует указать на экологическую безопасность применения разработанной нами вакциносодержащей безблистерной антирабической приманки, так как входящий в ее состав вирус бешенства – штамм «КМИЭВ-94» – по результатам ранее проведенных нами исследований является глубоко аттенуированным, апатогенным для мышевидных грызунов и плотоядных животных при пероральном введении даже в больших дозах (до 50 см³). Он не обладает также реверсibility. Об этом свидетельствуют и приведенные результаты применения его в природных условиях, в частности, отсутствие заболевания бешенством мышевидных грызунов и диких плотоядных животных, а также полная инактивация вируса в приманках при температурах плюс 18–20 °С через 9 дней после их раскладывания.

Выводы

1. Разработанная антирабическая вакцина для перорального применения в форме безблистерной приманки состоит из фиксированного вируса бешенства (штамм «КМИЭВ-94»), мясокостной и пшеничной муки, желатина, глицерина и тетрациклина.

2. Технология изготовления вирусосодержащих безблистерных приманок заключается в следующем. На 400 приманок берут 2,5 кг мясокостной, 1,5 кг пшеничной муки и тщательно перемешивают. 300 г желатина растворяют в 1,0 л горячей воды и добавляют туда 450 см³ глицерина, раствор вносят в смесь мясокостной и пшеничной муки, тщательно перемешивают и охлаждают до плюс 4 °С. В полученную массу вносят 1000 см³ вакцинного вируса с титром $6,5\text{--}7,0 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{мл}$, добавляют 50,0 г тетрациклина (метка для учета поедаемости животными приманок) и после тщательного перемешивания в пластиковых формах готовят приманки массой 20–30 г, которые сразу замораживают и хранят при минус 20–25 °С.

3. Эффективным способом размножения фиксированного вируса бешенства штамм «КМИЭВ-94» для вакцины является биореакторный на клетках ВНК-21/13 со средой Игла МЕМ, когда вирус в количестве 0,14–0,6 ТКИД₅₀/кл вносят в реактор одновременно с клетками и собирают урожай на 3–4-е сутки культивирования. Титр вируса при этом составлял 6,5–7,0 lg MICLD₅₀/мл. При роллерном культивировании титр был ниже.

4. Разработанная вакциносодержащая антирабическая приманка при плюсовых температурах в течение 5 дней сохраняла инфекционную активность вируса, форму и консистенцию, хорошо поедалась плотоядными животными как в лабораторных, так и природных условиях и через 1–3 мес после поедания приводила к выработке у них вируснейтрализующих антител в защитных титрах 5,6–8,0 log₂.

5. Применение разработанной вакциносодержащей безблистерной антирабической приманки в природных условиях экологически безопасно, так как входящий в ее состав вирус бешенства «КМИЭВ-94» является глубоко аттенуированным, апатогенным для мышевидных грызунов и плотоядных животных при пероральном введении, не обладает реверсибельностью и через 9 дней хранения приманки при температуре плюс 18–20 °С инактивируется.

Использование разработанной антирабической приманки на практике позволит снизить заболеваемость животных и людей и даст предполагаемый ежегодный экономический эффект в республике свыше 10 млн руб.

Высокая эффективность, безвредность, простота технологии изготовления и относительная дешевизна разработанной приманки свидетельствуют о перспективности ее внедрения в практику, что позволит снизить заболеваемость животных и людей бешенством и даст предполагаемый экономический эффект в республике свыше 10 млн руб. в год.

Благодарности. Авторы выражают благодарность д.в.н., д.б.н., профессору П. А. Красочко (УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины») и главному ветврачу района Н. В. Малинцу (ветеринарная служба Молодечненского района Минской области) за оказанную помощь при выполнении данной работы.

Список использованных источников

1. *Таршис, М. Г.* Бешенство животных / М. Г. Таршис, Н. А. Ковалев, П. П. Кузнецов. – Минск : Ураджай, 1990. – 175 с.
2. *Ковалев, Н. А.* Состояние и проблемы профилактики зооантропонозных болезней животных в XXI веке / Н. А. Ковалев, П. А. Красочко // Аграрная наука на рубеже XXI века : материалы Общ. собр. Акад. аграр. наук Респ. Беларусь, Минск, 16 нояб. 2000 г. / М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Акад. аграр. наук Респ. Беларусь; ред.: В. С. Антонюк [и др.]. – Минск, 2000. – С. 231–234.
3. *Назаров, В. П.* Бешенство животных / В. П. Назаров. – М. : Сельхозгиз, 1961. – 160 с.
4. *Зибицкер, Д. Е.* Бешенство и его профилактика: по материалам Белоруссии / Д. Е. Зибицкер, Н. А. Ковалев. – Минск : Урожай, 1968. – 200 с.
5. *Селимов, М. А.* Бешенство / М. А. Селимов. – М. : Медицина, 1978. – 336 с.
6. Cell culture rabies vaccines and their protective effect in man : proc. of WHO Consultations, Essen, Federal Rep. of Germany, 5–7 Mar. 1980 / ed.: E. K. Kuwert, T. J. Wictor, H. Kaprowski. – Geneva : Intern. Green Cross, 1981. – 355 p.
7. *Ковалев, Н. А.* Изучение бешенства и разработка средств и способов его профилактики в Беларуси / Н. А. Ковалев, Д. В. Бучукури // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2014. – №4. – С. 96–102.
8. Актуальные задачи профилактики бешенства среди диких плотоядных животных / Д. В. Бучукури [и др.] // Ветеринарная наука – производству : науч. тр. / Нац. акад. наук Беларусі, Ин-т эксперим. ветеринарии им. С. Н. Вышелесского НАН Беларусі. – Минск, 2005. – Вып. 38. – С. 139–141.
9. *Matouch, O.* Elimination of rabies in the Czech Republic by oral vaccination of foxes / O. Matouch, J. Vitasek // Rabies Bull. Europe. – 2005. – Vol. 29, N 1. – P. 10–15.
10. *Vitasek, J.* A review of rabies elimination in Europe / J. Vitasek // Veterinární Medicína. – 2004. – Vol. 49, N 5. – P. 171–185. <https://doi.org/10.17221/5692-VETMED>
11. Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments / A. I. Wandeler [et al.] // Rev. of Infectious Diseases. – 1988. – Vol. 10, suppl. 4. – P. S649–S653. https://doi.org/10.1093/clinids/10.supplement_4.s649
12. Oral vaccination of wildlife against rabies: differences among host species in vaccine uptake efficiency / A. Vos [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, iss. 32. – P. 3938–3944. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.022>
13. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife / L. Geue [et al.] // Vaccine. – 2008. – Vol. 26, iss. 26. – P. 3227–3235. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.007>
14. *Folman, E. H.* Oral vaccination of captive arctic foxes with lyophilized SAG 2 rabies vaccine / E. H. Folman, D. G. Ritter, D. W. Harbauer // J. of Wildlife Diseases. – 2004. – Vol. 40, iss. 2. – P. 328–334. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.328>

15. Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe / T. F. Müller [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2015. – Vol. 9, iss. 8. – Art. e0003953. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003953>
16. Elimination of terrestrial rabies in Germany using oral vaccination of foxes / T. Müller [et al.] // *Berliner u. Münchener Tierärztliche Woch.-Schr.* – 2012. – Bd. 125, H. 5/6. – S. 178–190. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-125-178>
17. Emergency oral rabies vaccination of foxes in Italy in 2009–2010: identification of residual rabies foci at higher altitudes in the Alps / P. Mulatti [et al.] // *Epidemiology and Infection*. – 2012. – Vol. 140, N 4. – P. 591–598. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001282>
18. Ковалев, Н. А. Состояние и перспективы оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства / Н. А. Ковалев // *Ветеринар. медицина Беларуси*. – 2007. – № 1. – С. 27–30.
19. Mishaeva, N. P. Rabies in Belarus / N. P. Mishaeva, A. V. Slavinskij, N. A. Kowaljev // *Rabies Bull. Europe*. – 2006. – Vol. 30, N 4. – P. 5–8.
20. Бучукуру, Д. В. Противозoonотическая эффективность вакцины из штамма вируса бешенства КМИЭВ-94 для пероральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства / Д. В. Бучукуру, Н. А. Ковалев, М. М. Усеня // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. наук*. – 2009. – № 3. – С. 86–91.
21. Ковалев, Н. А. Иммунопрофилактика бешенства в современных условиях / *Ветеринарная наука – производству: науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперимент. ветеринарии им. С. Н. Вышелеского НАН Беларуси*. – Минск, 2005. – Вып. 38. – С. 278–284.

References

1. Tarshis M. G., Kovalev N. A., Kuznetsov P. P. *Animal rabies*. Minsk, Uradzhai Publ., 1990. 175 p. (in Russian).
2. Kovalev N. A., Krasochko P. A. Status and problems of prevention of zoonanthroponotic animal diseases in the XXI century. *Agrarnaya nauka na rubezhe XXI veka: materialy Obshchego sobraniya Akademii agrarnykh nauk Respubliki Belarus', Minsk, 16 noyabrya 2000 g.* [Agrarian science at the turn of the XXI century: proceedings of the General Meeting of the Academy of Agrarian Sciences of the Republic of Belarus, Minsk, November 16, 2000]. Minsk, 2000, pp. 231–234 (in Russian).
3. Nazarov V. P. *Animal rabies*. Moscow, Sel'khozgiz Publ., 1961. 160 p. (in Russian).
4. Zibitsker D. E., Kovalev N. A. *Rabies and its prevention*. Minsk, Urozhai Publ., 1968. 200 p. (in Russian).
5. Selimov M. A. *Rabies*. Moscow, Meditsina Publ., 1978. 336 p. (in Russian).
6. Kuwert E. K., Wiktor T. J., Koprowski H. (eds.). *Cell culture rabies vaccines and their protective effect in man: proceedings of WHO Consultations, Essen, Federal Republic of Germany 5–7 March 1980*. Geneva, International Green Cross, 1981. 355 p.
7. Kovalev N. A., Buchukuri D. V. Study of rabies and development of methods of its prophylaxis in Belarus. *Vestsi Natsyonal'най akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2014, no. 4, pp. 96–102 (in Russian).
8. Buchukuri D. V., Kovalev N. A., Usenya M. M., Ulasovich P. I. Current challenges in rabies prevention in wild carnivores. *Veterinarnaya nauka – proizvodstvu: nauchnye trudy* [Veterinary science to production: scientific works]. Minsk, 2005, iss. 38, pp. 139–141 (in Russian).
9. Matouch O., Vitasek J. Elimination of rabies in the Czech Republic by oral vaccination of foxes. *Rabies Bulletin Europe*, 2005, vol. 29, no. 1, pp. 10–15.
10. Vitasek J. A review of rabies elimination in Europe. *Veterinárni medicína = Veterinary Medicine*, 2004, vol. 49, no. 5, pp. 171–185. <https://doi.org/10.17221/5692-VETMED>
11. Wandeler A. I., Capt S., Kappeler A., Hauser R. Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988, vol. 10, suppl. 4, pp. S649–S653. https://doi.org/10.1093/clinids/10.supplement_4.s649
12. Vos A., Hundt B., Kaiser C., Neubert A., Nolden T., Teifke J. P., Kamp V., Ulrich R., Finke S., Müller T. *Oral vaccination of wildlife against rabies: differences among host species in vaccine uptake efficiency*. *Vaccine*, 2017, vol. 35, iss. 32, pp. 3938–3944. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.022>
13. Geue L., Schares S., Schnick C., Kliemt J., Beckert A., Freuling C., Conraths F. J., Hoffmann B., Zanoni R., Marston D., McElhinney L., Johnson N., Fooks A. R., Tordo N., Müller T. *Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife*. *Vaccine*, 2008, vol. 26, iss. 26, pp. 3227–3235. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.007>
14. Folman E. H., Ritter D. G., Harbauer D. W. Oral vaccination of captive arctic foxes with lyophilized SAG 2 rabies vaccine. *Journal of Wildlife Diseases*, 2004, vol. 40, iss. 2, pp. 328–334. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.328>
15. Müller T. F., Schröder R., Wysocki P., Mettenleiter T. C., Freuling C. M. Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2015, vol. 9, iss. 8, art. e0003953. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003953>
16. Müller T., Bätza H. J., Freuling C., Kliemt A., Kliemt J., Heuser R., Schlüter H., Selhorst T., Vos A., Mettenleiter T. C. Elimination of terrestrial rabies in Germany using oral vaccination of foxes. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, vol. 125, no. 5/6, pp. 178–190. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-125-178>
17. Mulatti P., Müller T., Bonfanti L., Marangon S. Emergency oral rabies vaccination of foxes in Italy in 2009–2010: identification of residual rabies foci at higher altitudes in the Alps. *Epidemiology and Infection*, 2012, vol. 140, no. 4, pp. 591–598. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001282>

18. Kovalev N. A. The state and prospects of oral immunization of wild carnivores against rabies. *Veterinarnaya medicina Belarusi* [Veterinary Medicine of Belarus], 2007, no. 1, pp. 27–30 (in Russian).
19. Mishaeva N. P., Slavinskij A. V., Kowaljev N. A. Rabies in Belarus. *Rabies Bulletin Europe*, 2006, vol. 30, no. 4, pp. 5–8.
20. Buchukuri D. V., Kovalev N. A., Usenya M. M. Epizootic efficiency of the rabies strain KMIEV 94 for oral immunization of wild carnivores against rabies. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2009, no. 3, pp. 86–91 (in Russian).
21. Kovalev N. A. Immunization of rabies in modern conditions. *Veterinarnaya nauka – proizvodstvu: nauchnye trudy* [Veterinary science to production: scientific works]. Minsk, 2005, iss. 38, pp. 278–284 (in Russian).

Информация об авторах

Бучукури Джемал Владимирович – кандидат ветеринарных наук, зав. опытно-экспериментальным отделом, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladitim@tut.by

Ковалев Николай Андреевич – академик НАН Беларуси, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: knasveta@tut.by

Ломако Юрий Васильевич – кандидат ветеринарных наук, доцент, директор, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: lamakajuri@mail.ru

Борисовец Дмитрий Сергеевич – кандидат ветеринарных наук, доцент, зав. отделом вирусных инфекций, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: borisovets_bievm@mail.ru

Великий Сергей Викторович – аспирант, младший научный сотрудник опытно-экспериментального отдела, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: wialiki@gmail.com

Шпилевский Дмитрий Олегович – аспирант, ведущий биолог опытно-экспериментального отдела, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: andein@yandex.ru

Information about the authors

Buchukury Jemal V. - Ph.D. (Veterinary). S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladitim@tut.by.

Kovaliov Nikolai A. - Academician of the NAS of Belarus, D.Sc. (Veterinary). S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: knasveta@tut.by

Lamaka Yury V. - Ph.D. (Veterinary), Associate professor. S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lamakajuri@mail.ru

Barysavets Dzmitry S. - Ph.D. (Veterinary), Associate professor. S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: borisovets_bievm@mail.ru

Vjaliki Siarhei V. - Postgraduate student. S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: wialiki@gmail.com

Shpileuski Dzmitry O. - Postgraduate student. S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andein@yandex.ru