

УДК 619:616.98:578.324:578.74: 578.825.11

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-85-88>

Краткий обзор/Brief review

Шемельков Е.В.¹,
Верховский О.А.²,
Алипер Т.И.¹,
Куликова Т.С.¹,
Афанасьев С.А.¹

¹ ООО «Ветбиохим»

105120, Москва, 3-й Сыромятнический пер., 3/9

E-mail: orgotdel@rosvet.ru

² Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных (АНО НИИ ДПБ)

123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16, стр. 2

E-mail: verkhovsky@rosvet.ru

Ключевые слова: болезнь Ауески, вирус, маркированная вакцина, гликопротеины gB и gE, антигенная активность, антитела.

Для цитирования: Шемельков Е.В., Верховский О.А., Алипер Т.И., Куликова Т.С., Афанасьев С.А. Инактивированная маркированная вакцина против болезни Ауески. *Аграрная наука*. 2021; 347 (4): 85–88.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-85-88>**Конфликт интересов отсутствует**

Eugene V. Shemelkov¹,
Oleg A. Verkhovsky²,
Taras I. Aliper¹,
Tatiana S. Kulikova¹,
Sergey A. Afanasyev¹

¹ LLC "Vetbiohim"

105120, Moscow, 3rd Syromyatnichesky per., 3/9

E-mail: orgotdel@rosvet.ru

² Scientific Research Institute for Diagnostics and Prevention of Human and Animal Diseases
123098, Moscow, st. Gamalei, 16-2.

E-mail: verkhovsky@rosvet.ru

Key words: Aujeszky's disease, virus, marked vaccine, gB and gE glycoproteins, antigenic activity, antibodies

For citation: Shemelkov E.V., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Kulikova T.S., Afanasyev S.A. Inactivated marked vaccine against Aujeszky's disease. *Agrarian Science*. 2021; 347 (4): 85–88. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-347-4-85-88>**There is no conflict of interests**

Инактивированная маркированная вакцина против болезни Ауески

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты оценки напряженности и продолжительности иммунного ответа у поросят на введение инактивированной маркированной вакцины против болезни Ауески в сравнении с аналогичными показателями на иммунизацию живой маркированной и инактивированной немаркированной вакцинами. Иммунизация инактивированной маркированной вакциной индуцировала выработку вируснейтрализующих антител на высоком уровне.

Inactivated marked vaccine against Aujeszky's disease

ABSTRACT

The article presents data on the results of assessing the intensity and duration of the immune response in piglets to the introduction of inactivated marked vaccine against Aujeszky's disease in comparison with similar indicators for immunization with live labeled and inactivated unlabeled vaccines. Immunization with an inactivated marked vaccine induced the production of virus neutralizing antibodies at a high level.

Поступила: 30 марта
После доработки: 5 апреля
Принята к публикации: 5 апреля

Received: 30 March
Revised: 5 April
Accepted: 5 April

Введение

Возбудитель болезни — ДНК-содержащий вирус, относится к роду *Varicellovirus* семейству *Herpesviridae* [1, 2].

Вирион вируса представляет собой сферическую частицу размером около 200 нм, состоящую из сердцевинки (которая содержит ДНК), капсида, тегумента и липопротеиновой оболочки. Икосаэдрический капсид построен из 12 пентонов и 150 гексонов. Вокруг капсида расположен тегумент — электроно-плотный волокнистый материал, содержащий не менее 15 различных белков. Липопротеиновая оболочка содержит 10 гликопротеинов, три из которых (gB, gC и gD) играют важную роль в развитии протективного иммунитета [1, 2, 3].

Вирус болезни Ауески хорошо размножается в перевиваемых культурах клеток с ярко выраженным цитопатическим эффектом [4, 11].

Вирус является пантропным, однако имеет склонность к нейротропизму и пневмотропизму, кроме того он способен поражать клетки иммунной системы, вызывая иммунодефицитные состояния. У переболевших свиней заболевание может переходить в латентную форму, при которой вирус может пожизненно персистировать в клетках центральной нервной системы, миндалин и лимфоузлов [1, 4].

Первый случай возникновения болезни Ауески был описан в 1813 году, американский исследователь доктор Хилдрет зафиксировал случай «безумного зуда» у коровы. Из-за сходства клинической картины заболевания с бешенством оно получило название «pseudorabies» (псевдобешенство). Первый клинический случай проявления болезни Ауески у свиней в 1902 году описал венгерский ветеринарный врач Аладар. Интенсивное развитие свиноводства в 60–70 годах прошлого столетия способствовало широкому распространению данного заболевания, которое стало наносить значительный экономический ущерб отрасли в целом [5, 6].

Наиболее эффективным способом борьбы с вирусом болезни Ауески является специфическая иммунопрофилактика, в том числе и с использованием маркированных вакцин, позволяющих реализовывать стратегию DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) [7, 8, 9, 10].

В настоящее время подавляющее количество коммерчески доступных маркированных вакцинных препаратов составляют живые вакцины, содержащие живой маркированный вирус болезни Ауески. В основе эффективности таких препаратов лежит имитация субклинической инфекции, в ходе развития которой вакцинный вирус размножается в организме животного, вызывая легкую, как правило бессимптомную, форму инфекции. Таким образом, сохраняется риск горизонтальной передачи вакцинного вируса с возможной последующей его персистенцией в хозяйстве [5, 6, 8, 11, 12].

Вакцинный штамм вируса болезни Ауески продолжает циркулировать среди поголовья внутри хозяйства в течение нескольких лет после прекращения использования живой вакцины [4, 10, 11]. В своей практике в одном из свиноводческих хозяйств Вологодской области мы имели случай обнаружения антител к гликопротеину gB вируса болезни Ауески при полном отсутствии антител к гликопротеину gE (серологическая картина, характерная для применения маркированной вакцины) в стаде основных свиноматок, которых последний раз иммунизировали живой коммерческой зарубежной вакциной против болезни Ауески более 3 лет назад.

На этом фоне актуальным видится направление по разработке и внедрению отечественных инактивиро-

ванных маркированных вакцин, которые также могут быть использованы для реализации стратегии DIVA по эрадикации болезни Ауески.

Цель работы: провести сравнительную оценку напряженности и продолжительности иммунного ответа у поросят на введение инактивированной маркированной, живой маркированной и инактивированной немаркированной вакцин против болезни Ауески.

Материалы и методы

В качестве вакцинного штамма для изготовления инактивированной и живой маркированных вакцин использовали штамм «Скиф» вируса болезни Ауески (ВБА), ранее полученный коллективом авторов во главе с профессором Сергеевым В.А. Штамм «Скиф» имеет генетически стабильную делецию гена, кодирующего один из структурных белков вириона — гликопротеин gE.

Накопление вируса осуществляли в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи — СПЭВ, инфекционную активность вируса определяли методом титрования в указанной культуре клеток. Накопление вируса в клеточной культуре оценивали по цитопатическому действию, инфекционный титр вычисляли по методу Риды и Менча и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³. Наличие маркера (делеции гена) у вируса контролировали методом ПЦР в режиме реального времени [9].

Экспериментальные образцы вакцин готовили из одного пула вируса болезни Ауески с исходной инфекционной активностью 7,0 Ig ТЦД₅₀/см³.

Для изготовления экспериментального образца № 1 (содержащего инактивированный маркированный вирус) часть пула вирусосодержащего материала подвергли инаktivации путем добавления формалина до конечной концентрации 0,3%, время экспозиции — 72 часа при температуре 37 °С. В качестве адъюванта использовали синтетический сополимер полиакриловой кислоты (карбомер). Содержание антигенной части (инактивированного ВБА) в образце № 1 составило 50%.

Для изготовления экспериментального образца № 2 (содержащего живой маркированный вирус) оставшуюся часть пула вирусосодержащего материала подвергли лиофильному высушиванию, предварительно смешав с защитной средой высушивания.

В качестве контроля (образец № 3) использовали коммерческую эмульгированную вакцину, которая в своем составе содержит инактивированный немаркированный штамм «К1» вируса болезни Ауески. Количество содержания и инфекционная активность вируса болезни Ауески (до инаktivации) в образце № 3 аналогичны образцу № 1. В качестве адъюванта вакцина содержала минеральное масло и сурфактант.

Каждым образцом вакцины иммунизировали группу поросят ($n = 11$), сформированную по принципу аналогов, внутримышечно двукратно с интервалом 21 сутки. Возраст поросят на начало эксперимента составил 3,5–4 месяца, все животные ранее не подвергались вакцинации против болезни Ауески.

Инактивированные маркированную и немаркированную вакцины (образец № 1 и образец № 3 соответственно) вводили в дозе 2 мл.

Живую маркированную вакцину (образец № 2) предварительно растворяли стерильным физиологическим раствором до такой концентрации, чтобы в одной прививочной дозе (1 мл) содержалось 5 Ig ТЦД₅₀/см³.

В качестве отрицательного контроля использовали группу ($n = 3$) невакцинированных поросят того же возраста.

Кровь брали у всех животных, использованных в опыте, до и через 21 сутки после первой вакцинации, а также каждые 30–32 суток после второй вакцинации на протяжении 4 месяцев.

Условия кормления и содержания были идентичны для всех животных.

Материалом для серологических исследований служили пробы сыворотки крови экспериментальных животных, в которых определяли титр вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации (РН), относительное содержание специфических антител к гликопротеину gB и к гликопротеину gE вируса болезни Ауески — иммуноферментным методом (ИФА).

РН ставили микрометодом по общепринятой методике. За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, которое сдерживало ЦПД вируса в 50% зараженных культур клеток.

Для выявления антител в ИФА использовали соответствующие коммерческие наборы (ООО «Ветбиохим», Россия). Постановку реакции, учет и интерпретацию полученных результатов проводили согласно наставлениям по применению, рекомендованным фирмой-производителем. Наличие маркера в соответствующих вакцинах определяли по наличию в сыворотке крови вируснейтрализующих и gB-специфических антител на фоне отсутствия антител к гликопротеину gE.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методиками с использованием программ Microsoft Office Excel 2017, Stat Plus 2009.

Результаты исследований и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три образца вакцин обладают выраженной антигенной активностью, индуцируя выработку вируснейтрализующих антител у иммунизированных животных. Ожидаемо образцы, изготовленные на осно-

ве маркированного штамма вируса болезни Ауески, индуцировали синтез специфических антител к гликопротеину gB, при этом не провоцируя появления антител к гликопротеину gE (таблица 1, рисунок 1).

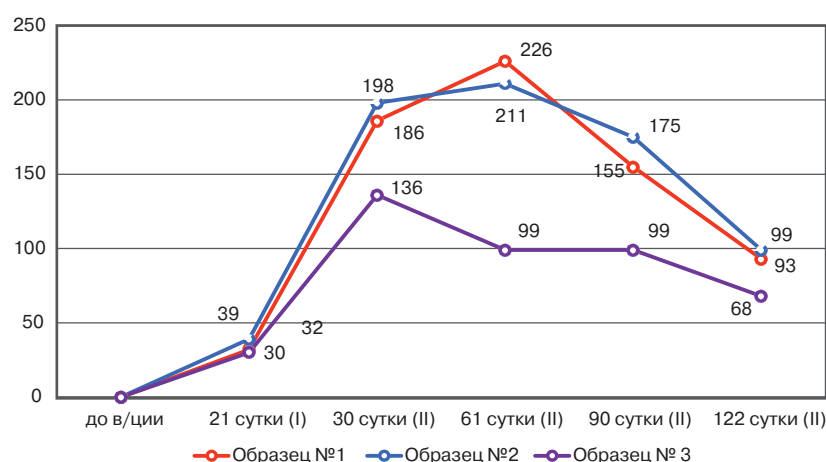
Как следует из представленных результатов, введение образцов инактивированной и живой маркированной вакцин сопровождалось выработкой специфических антител к гликопротеину gB уже после первой вакцинации. При этом уровень указанных антител оставался достаточным для выявления методом ИФА на протяжении всего времени эксперимента у поросят обеих групп.

Введение инактивированной немаркированной вакцины индуцировало синтез антител к обоим гликопротеинам вируса после первой вакцинации, которые также сохранялись до конца опыта. В контрольной группе животных антител к гликопротеинам gB и gE обнаружено не было.

Использованные образцы вакцин вызывали разный уровень гуморального иммунного ответа к вирусу болезни Ауески ($P < 0,04$).

Рис. 1. Антигенная активность испытуемых образцов (уровень вируснейтрализующих антител к вирусу болезни Ауески*)

Fig. 1. Antigenic activity of the tested samples (level of neutralizing antibodies to the Aujeszky disease virus*)



* — приведены средние геометрические значения титра вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных соответствующих групп, выраженные в обратных величинах

Таблица 1. Антигенная активность испытуемых образцов в отношении гликопротеинов gB и gE вируса болезни Ауески

Table 1. Antigenic activity of the test samples against glycoproteins gB and gE of Aujeszky's disease virus

| Группа, образец вакцины | № 1 (маркированная инактивированная вакцина) | | № 2 (маркированная живая вакцина) | | № 3 (не маркированная инактивированная вакцина) | | № 4 (невакцинированные животные) | |
|---|--|----|-----------------------------------|----|---|----|----------------------------------|----|
| Срок исслед. | наличие антител к гликопротеину* | | | | | | | |
| | gB | gE | gB | gE | gB | gE | gB | gE |
| До вакцинации | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 21-е сутки после I | + | – | + | – | + | + | – | – |
| 30-е сутки после II | + | – | + | – | + | + | – | – |
| 61-е сутки после II | + | – | + | – | + | + | – | – |
| 90-е сутки после II | + | – | + | – | + | + | – | – |
| 122-е сутки после II | + | – | + | – | + | + | – | – |
| 151-е сутки после II | + | – | + | – | + | + | – | – |
| * — приведены обобщенные данные по каждой группе животных, поскольку результаты были идентичны у всех поросят внутри одной группы | | | | | | | | |

* — приведены обобщенные данные по каждой группе животных, поскольку результаты были идентичны у всех поросят внутри одной группы

В целом, максимальный уровень вируснейтрализующих антител наблюдали в период 30–61-е сутки после второй вакцинации, затем он постепенно снижался, но оставался достаточно высоким (1:68–1:99) до конца эксперимента.

Наиболее антигенно активной была живая маркированная вакцина (образец № 2), после применения которой наблюдали ровную динамику синтеза и последующего снижения уровня вируснейтрализующих антител.

Максимально пиковое значение уровня антител (1:226) зафиксировали на 61-е сутки после второй вакцинации инактивированной маркированной вакциной (образец № 1), однако в последующем он снижался немного быстрее, чем во второй группе животных, но оставался высоким (1:93) до конца опыта.

Иммунизация образцом вакцины № 3, изготовленной на основе инактивированного немаркированного штамма вируса, индуцировала выработку специфических антител на достаточном для защиты уровне, который также сохранялся до конца эксперимента, но в целом антигенная активность данного образца была ниже, чем в первой и второй группах.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали пригодность использования маркированного штамма «Скиф» вируса болезни Ауески для изготовления инактивированных маркированных вакцин.

Сравнительная оценка напряженности и продолжительности иммунного ответа у поросят свидетельствует о том, что инактивированная маркированная вакцина не уступает по данным показателям живой маркированной вакцине и несколько превосходит по уровню индуцируемых вируснейтрализующих антител инактивированную вакцину, изготовленную из немаркированного штамма вируса болезни Ауески. При этом вакцинный штамм вируса болезни Ауески имеет характерный маркер — генетически стабильную делецию гена, кодирующего гликопротеин gE, что в последующем легко выявляется серологическими методами (ИФА). То есть использование инактивированной маркированной вакцины делает возможным внедрение стратегии DIVA для проведения профилактических и оздоровительных мероприятий в промышленном свиноводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: «Медицинское информационное агентство». 2013. 1200 с. [Lviv DK. Viruses and viral infections of humans and animals. M.: "Meditsinskoe informatsionnoe agenstvo". 2013. 1200 p. (In Russ)].
2. Сергеев ВА, Непоклонов ЕА, Алипер ТИ. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика. 2007. 524 с. [Sergeev VA, Nepoklonov EA, Aliper TI. Viruses and viral vaccines. M.: Bibliionika. 2007. 524 p. (In Russ)].
3. Сюрин ВН, Самуйленко АЯ, Соловьев БВ, Фомина НВ. Вирусные болезни животных. М.: ВНИИТИБП. 1998. 928 с. [Syurin VN, Samuilenko AY, Soloviev BV, Fomina NV. Viral diseases of animals. M.: VNIITIBP. 1998. 928 p. (In Russ)].
4. Шемельков ЕВ, Котельников АП, Куликова ТС, Мишин АМ, Верховский ОА, Алипер ТИ. Разработка и оценка эффективности живой маркированной вакцины против болезни Ауески «VERRES-BAgE-» *Ветеринария*. 2018(6):21-27. [Shemelkov EV, Kotelnikov AP, Kulikova TS, Mishin AM, Verkhovsky OA, Aliper TI. Development and evaluation of the effectiveness of live labeled vaccine against Aujeszky's disease "VERRES-BAgE-» *Veterinariya*. 2018 (6): 21-27. (In Russ).]
5. Чернов АН. Особенности эпизоотической ситуации и оценка эффективности вакцинопрофилактики при болезни Ауески. В сборнике: Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Казань. 2013;213: 314-318 с. [Chernov AN. Peculiarities of the epizootic situation and assessment of the effectiveness of vaccine prophylaxis in Aujeszky's disease. In the collection: Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine. N.E. Bauman. Kazan. 2013; 213: 314-318 p. (In Russ)].

6. Gu Z, Hou C, Sun H, Yang W, Dong J, Bai J, Jiang P. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in southern China. *Can J Vet Res*. 2015 Jul 31; 79(3):221-8.

7. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals chapter 2.1.2. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.02_AUJESZKYS_DIS.pdf

8. Кукушкин СА. Основы контроля и искоренения болезни Ауески в свиномкомплексах России. *Ветеринария*. 2015(4):13-18.

[Kukushkin SA. Fundamentals of control and eradication of Aujeszky's disease in pig farms in Russia. *Veterinariya*. 2015 (4): 13-18. (In Russ).]

9. Ma W, Lager KM, Richt JA, Stoffregen WC, Zhou F, Yoon KJ. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J Vet Diagn Invest*. 2008 Jul; 20(4):440-7. <https://doi.org/10.1177/104063870802000405>

10. Bayry J. (editor) Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock. Springer International Publishing AG 2017 513 p.

11. Баборенко ЕП. Изучение поствакцинального иммунитета при использовании вакцин против вируса болезни Ауески свиней из маркированного штамма. *Ветеринария сегодня*. 2016;(4):49-52. [Baborenko EP. Study of postvaccinal immunity after use of marked strain-based vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Veterinary Science Today*. 2016;(4):49-52. (In Russ).]

12. Dong B, Zarlenga DS, Ren X. An overview of live attenuated recombinant pseudorabies viruses for use as novel vaccines. *J Immunol Res*. Published online 2014 Jun 5. doi: 10.1155/2014/824630

ОБ АВТОРАХ:

Шемельков Евгений Владимирович, к.в.н., начальник ОКК
Верховский Олег Анатольевич, д.б.н., президент
Алипер Тарас Иванович, д.б.н., председатель совета директоров
Куликова Татьяна Сергеевна, сотрудник ОК
Афанасьев Сергей Анатольевич, микробиолог ОКК

ABOUT THE AUTHORS:

Shemelkov Evgeny Vladimirovich, Ph.D., Head of the quality control department
Verkhovsky Oleg Anatolyevich, Doctor of Biological Sciences, President
Aliper Taras Ivanovich, Doctor of Biological Sciences, Chairman of the Board of Directors
Kulikova Tatyana Sergeevna, employee of the quality control department
Afanasyev Sergey Anatolyevich, microbiologist of the quality control department