



Конструирование вакцины

для профилактики
коронавирусной инфекции
и пастереллеза норок

Вакцинопрофилактика играет решающую роль в предотвращении инфекционных заболеваний у ценных меховых животных. Это особенно актуально для звероферм, где высокая плотность содержания создает благоприятные условия для распространения патогенов. Инактивированная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции и пастереллеза норок должна быть адаптирована к актуальным циркулирующим штаммам возбудителей в конкретном регионе. Согласно проведенным в Республике Беларусь исследованиям, у пушных зверей преобладают случаи пастереллеза, вызванные серовариантами А. В отношении вируса SARS-CoV-2 следует отметить, что восприимчивость к нему не ограничивается норками. Подвержены заражению хорьки, а также представители семейства кошачьих, такие как львы и тигры [1].

Согласно информации Всемирной организации по охране здоровья животных, существует доказательство того, что норки способны заразиться коронавирусом SARS-CoV-2 от человека. Отмечена и возможность передачи вируса от норок к людям. Первые могут выступать в роли резервуара для вируса, инфицируя друг друга и создавая потенциальный риск для человека, который, заразившись, распространяет его в своей популяции. Возможна и обратная передача (в Дании зафиксировано более 100 случаев), при этом не исключены генетические модификации. В десятках случаев (зарегистрированы в регионе Северная Ютландия) обнаружена уникальная вариация вируса с комбинацией мутаций, ранее не встречавшейся. Клинические проявления заболевания у инфицированных лиц были анало-

Юлия Каяк,
заведующий отраслевой
референс-лабораторией Института
экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелесского



гичны симптомам COVID-19. По данным ВОЗ, данная вариация вируса характеризуется специфическим набором мутаций, отличающим ее от известных штаммов [2].

Случаи заражения вирусной инфекцией SARS-CoV-2 у норок зафиксированы также в Италии, Испании, Нидерландах, Швеции и США. По данным Всемирной организации по охране здоровья животных, опубликованным в информационном бюллетене в Женеве, Российская Федерация не входит в число стран, где наблюдались подобные случаи. Анализ доступной литературы показал, что с 23.04.2020 г., когда впервые была зарегистрирована вспышка SARS-CoV-2 на ферме в Нидерландах, о распространении вируса среди норок сообщалось из целого ряда стран, включая Данию, Канаду, Польшу, Францию, Грецию, Италию, Литву, Испанию, Швецию и США [3].

На базе Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского разработана технология изготовления вакцины инактивированной для профилактики коронавирусной инфекции,

вызванной вирусом SARS-CoV-2, и пастереллеза норок. Для этого выделены и подобраны штаммы *Pasteurella multocida* сероварианта А (КМИЭВ-67) и *Coronavirus of mink* SARS-CoV-2 (КМИЭВ-V145), отработаны различные оптимальные соотношения компонентов биопрепарата. Содержание микробных частиц определялось с помощью денситометра, проведена инаktivация полученной биомассы формалином в разных соотношениях. Контроль качества вакцины осуществлен по показателям внешнего вида, стерильности, безвредности, реактогенности, иммуногенности; концентрация водородных ионов оценена по общепринятым методам.

Биомассу *Pasteurella multocida* сероварианта А получили путем культивирования в реакторе в жидкой питательной среде с добавлением стерильной сыворотки. Культуру очищали на высокоскоростной проточной центрифуге. Для отработки метода инаktivации бактериосодержащей жидкости был использован формалин (от 0,1 до 0,5%, с содержанием не менее 36% формальдегида), который предварительно разводили дистиллированной водой в соотношении 1:1, добавляя при постоянном помешивании до достижения 0,5%-ного конечного показателя в среде. Инаktivацию культуры проводили не менее 120 ч при температуре от +37 до +42 °С, перемешивая несколько раз в сутки. Результативность проверяли путем посева культур на питательные среды с МПБ, МПА в объеме 0,2 см³, которые затем выдерживали в термостате при температуре от +37 до +38 °С в течение 10 суток.

Для отработки метода инаktivации вирусосодержащей культуральной жидкости применяли различные концентрации β-пропиолактона (BPL) – от 0,01% до 0,5%. Время инкубирования составило 16–20 ч при +4 °С, при этом в течение первых 2 ч не наблюдалось токсического эффекта, что подтверждено при проведении 3 последовательных пассажей на клетках Vero E6. Оценивали полноту инаktivации вируса путем 2 последовательных пассажей (с периодом инкубации 5 суток для каждого) с помощью вирусосодержащей инаktivированной культуральной жидкости и стандартной среды поддержки в соотношении 1:1.

Нами были выбраны в качестве адъюванта гидрат окиси алюминия, раствор алюмокалиевых квасцов и «Montanide ISA 15A VG», который использовали

для первого образца в соотношении 15% к 85% антигенной части. Соединяли компоненты в стерильных условиях при комнатной температуре, при этом адъювант добавляли в антигенную часть и перемешивали со скоростью 100 об/мин в течение нескольких минут. В результате получили эмульсию антигена типа «масло в воде», предназначенную для формирования у пушных животных иммунитета средней продолжительности. В другом образце биологического препарата в качестве адъюванта выступал гидрат окиси алюминия. В антигенную составляющую был добавлен стерильный раствор 6%-ного гидрата окиси алюминия в объеме 15%. В третьем образце вакцины был задействован 10%-ный стерильный раствор алюмокалиевых квасцов, который добавляли в количестве 5% от общего объема препарата. Таким образом отработаны различные пропорции компонентов «вирус:бактерия» – 1:1, 2:1, 1:2. При соотношении вирусного и бактериального антигена 2:1 обеспечивается выработка специфических антител в титрах на 0,2–0,4 log² выше в сравнении с образцом 1:1.

Безопасность биопрепарата оценивали путем однократного подкожного введения дозы 0,5 см³ белым мышам массой 18–20 г и наблюдали за животными в течение 10 дней. Реактогенность вакцины проверяли на кроликах при однократном внутримышечном введении с внутренней стороны бедра. Животные также находились под наблюдением в течение 10 дней, включая ежедневный клинический осмотр с измерением температуры тела, затем проводилось вскрытие с целью оценки состояния места инъекции.

Вакцину изготовили из *Pasteurella multocida* тип А (штамм КМИЭВ-67) и штамма коронавируса *Coronavirus of mink* SARS-CoV-2 (КМИЭВ-V145). Для активации сухой культуры ее растворяли в небольшом объеме мясо-пептонного бульона (1–2 см³). Полученную суспензию переносили в пробирку с МПБ и инкубировали в течение 18 ч при *t* от +37 до +38 °С. Последующая обработка включала

двухкратный пересев через каждые 6 ч в среде МПБ. Затем культуру высевали на чашки Петри, содержащие 2%-ный агар МПА, с целью выделения колоний, имеющих исключительно S-форму. В дальнейшем свойства полученных штаммов исследовали с этими колониями.

Штамм коронавируса *Coronavirus of mink* SARS-CoV-2 (КМИЭВ-V145) культивировали на культуре



клеток Vero E6 в питательной среде ДМЕМ с добавлением антибиотика гентамицина в концентрации 50 мкг/мл. Клеточный детрит удалялся посредством капсульного мембранного фильтра из полиэфирсульфона. Процедуры концентрирования и очистки проводили с применением системы тангенциальной фильтрации Sartoflow Smart Cross Flow System (Sartorius, Германия) с помощью фильтрующей кассеты Sartocap Slice 200 ECO. Инфекционная активность вируса по цитопатическому действию (ЦПД) на протяжении 10 последовательных пассажей по титрам была наибольшей на 6-м и составляла 6,0–6,7 TCID₅₀ (50%-ная тканевая цитопатическая доза).

Отработаны различные соотношения компонентов бактериальной и вирусной составляющей 1:1, 1:2, 2:1. Самым оптимальным оказалось 1:2. Содержание микробных клеток (определялось на денситометре по МакФарленду) достигало 6,0 ед.

	Группа 1	Группа 2	Контрольная группа
Соотношение монокомпонентов	2:1	1:1	Физраствор (на основе гидроксида алюминия)
Титр антибактериальных антител, log ²	5,0±0	4,8±0,2	1,8±0,2
Титр противовирусных антител, log ²	4,0±0	3,6±0,2	0

Таблица. Оценка оптимального соотношения вирусного и бактериального антигенов в составе вакцины

Биомассу *Pasteurella multocida* сероварианта А получили путем культивирования в жидкой питательной среде с добавлением 5%-ной стерильной сыворотки в реакторе. Полученную 10-часовую культуру очищали на высокоскоростной проточной центрифуге. Для отработки метода инактивации бактериосодержащей культуральной жидкости брали различные концентрации формалина (с содержанием не менее 36% формальдегида – 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5%), который предварительно разводили дистиллированной водой в соотношении 1:1 и добавляли при постоянном помешивании. Инактивацию культур проводили в течение 4, 8, 12, 16, 20, 36, 48, 120 ч при *t* от +37 до +38 °С, перемешивая несколько раз в течение 5 мин. Ее полнота проверялась путем посева культур на питательные среды в объеме 0,05 и 0,2 см³ в пробирки с МПА и МПБ, которые выдерживали в термостате при *t* от +37 до +38 °С 10 суток. Во всех посевах в процессе культивирования роста не наблюдали.

Для отработки метода инактивации вирусосодержащей культуральной жидкости нами были использованы различные концентрации β-пропиолактона: 0,5, 0,1, 0,05, 0,01%. Установлено, что для полной инактивации вируса наиболее оптимален 0,05%-ный β-пропиолактон (BPL), время инкубирования – 16–20 ч при +4 °С, при этом после в течение 2 ч не наблюдалось токсического эффекта, что подтверждено 3 последовательными пассажами на клетках VERO E6. Оценку полноты инактивации вируса проводили путем 2 последовательных пассажей на клетках VERO E6 с применением вирусосодержащей инактивированной культуральной жидкости и стандартной среды поддержки в соотношении 1:1 с периодом инкубации в течение 5 суток для каждого пассажа. Таким образом отработаны условия химической инактивации вируса с последующей оценкой ее полноты. Полученный препарат вирусосодержащей культуральной жидкости применяли для последующего концентрирования вирусных частиц. В образце биологического препарата в качестве адъюванта выступал стерильный 6%-ный раствор гидрата окиси алюминия в объеме 15%. Результаты опыта (таблица) показали, что оптимальным соотношением вирусного и бактериального антигенов в составе вакцины является 2:1, при этом обеспечивается выработка специфических антител в титрах на 0,2–0,4 log² выше в сравнении с образцом с пропорцией монокомпонентов 1:1.

Все три варианта исследуемой вакцины с различными адъювантами соответствуют необходимым требованиям. Таким образом, разработана технология изготовления инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, и пастереллеза норки – стерильный, безвредный, ареактогенный и иммуногенный биопрепарат. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Baden L.R. Covid-19 – the search for effective therapy / L.R. Baden, E.J. Rubin // New England Journal of Medicine. 2020. Vol. 382, №19. P. 1851–1852.
2. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь // <https://www.kommersant.ru/doc/4564552>.
3. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь // <https://tass.ru/obschestvo/9938063>.
4. Азарян С.Л. Изучение реактогенности и иммуногенности противопастереллезных вакцин с различными адъювантами на лабораторных животных / С.Л. Азарян // Диагностика, профилактика и меры борьбы с инфекционными и инвазивными болезнями сельскохозяйственных животных и птиц на Северном Кавказе: сб. науч. тр. – Новочеркасск, 1990.
5. Басканьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Басканьян. – М., 1992.
6. Воробьев А.А., Васильев Н.Н. Адъюванты / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев. – М., 1969.
7. ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».