

# Исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных

А. В. Шишков<sup>1</sup>, Д. А. Лозовой<sup>2</sup>, А. В. Борисов<sup>3</sup>, Д. В. Михалишин<sup>4</sup>

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-9777-1404, e-mail: shishkov@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Бешенство имеет первоочередное значение в ряду вирусных болезней человека и животных, являясь одним из самых опасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы с неизбежным летальным исходом. Заболевание представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ВОЗ, МЭБ, FAO, GARC) и ветеринарные службы многих стран мира. Для специфической профилактики бешенства среди диких плотоядных животных применяют разнообразные антирабические вакцины, однако существуют сомнения в безопасности и эффективности некоторых из них. Ведутся разработки новых, более совершенных препаратов, одним из которых является антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак». Проведены исследования по изучению ее иммуногенных и протективных свойств для диких плотоядных животных. Оптимальная иммунизирующая доза препарата составляет 2,0 см<sup>3</sup> с титром инфекционной активности вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,00 lg ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Через 14 сут после оральной иммунизации данной вакциной антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах 0,70 ± 0,18 и 0,73 ± 0,19 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства (≥ 0,50 МЕ/см<sup>3</sup>). Спустя 50 сут уровень антирабических вируснейтрализующих антител у лисиц достигал максимальных значений и составлял 4,30 ± 0,32 МЕ/см<sup>3</sup>. Титр антител у вакцинированных енотовидных собак достигал максимальных значений также спустя 50 сут и был равен 4,53 ± 0,27 МЕ/см<sup>3</sup>. Минимальный пороговый уровень вируснейтрализующих антител определяли через 12 месяцев после иммунизации, он составлял у лисиц и енотовидных собак 0,62 ± 0,28 и 0,71 ± 0,17 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год. В результате контрольного заражения через 30 сут после вакцинации все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», в течение всего срока наблюдения не проявляли клинических признаков бешенства.

**Ключевые слова:** бешенство диких плотоядных животных, антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак», антирабические вируснейтрализующие антитела.

**Для цитирования:** Шишков А. В., Лозовой Д. А., Борисов А. В., Михалишин Д. В. Исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 31–37. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-31-37.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Шишков Александр Валерьевич, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: shishkov@arriah.ru.

## Testing of Ferarabivac anti-rabies live vaccine for wild carnivores for its immunogenicity and protectivity

A. V. Shishkov<sup>1</sup>, D. A. Lozovoy<sup>2</sup>, A. V. Borisov<sup>3</sup>, D. V. Mikhailishin<sup>4</sup>

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-9777-1404, e-mail: shishkov@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

## SUMMARY

Rabies is one of the most important human and animal viral diseases, being one of the most dangerous zoonoses, causing damage to the central nervous system with an inevitable fatal outcome. This disease is of global concern, and it attracts special attention of international organizations (WHO, OIE, FAO, GARC) and of veterinary services in many countries around the world. A variety of anti-rabies vaccines have been used for specific rabies prevention in wild carnivores, however, the safety and effectiveness of some of them is doubtful. New, more advanced products are being developed, one of which is Ferarabivac, a live oral vaccine. The vaccine was tested for

its immunogenicity and protectivity in wild carnivores. The optimal immunizing dose was 2.0 cm<sup>3</sup>, with the infectivity titre of RV-97 strain of at least 6.00 lg KКID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>. Anti-rabies antibody titres detected in the blood sera of foxes and raccoon dogs 14 days post vaccination, were 0.70 ± 0.18 and 0.73 ± 0.19 IU/cm<sup>3</sup>, respectively, which provided protection against rabies virus infection (≥ 0.50 IU/cm<sup>3</sup>). Rabies virus neutralizing antibodies in foxes reached their maximum level of 4.30 ± 0.32 IU/cm<sup>3</sup> 50 days post vaccination. Antibody titres in vaccinated raccoon dogs also reached their maximum level of 4.53 ± 0.27 IU/cm<sup>3</sup> 50 days post vaccination. The minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies was determined 12 months after the vaccination, and it was 0.62 ± 0.28 and 0.71 ± 0.17 IU/cm<sup>3</sup> in foxes and raccoon dogs, respectively, which proves the necessity to perform booster vaccination one year later. No animals vaccinated against rabies with Ferarabivac live vaccine showed any clinical signs of the disease during the entire observation period following the challenge test carried out 30 days post vaccination.

**Keywords:** rabies of wild carnivorous animals, Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine, rabies virus neutralizing antibodies.

**For citation:** Shishkov A. V., Lozovoy D. A., Borisov A. V., Mikhailishin D. V. Testing of Ferarabivac anti-rabies live vaccine for wild carnivores for its immunogenicity and protectivity. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 31–37. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-31-37.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Alexander V. Shishkov, Leading Veterinarian of the Laboratory for FMD Prevention FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: shishkov@arriah.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель бешенства, по данным Международного комитета по таксономии вирусов, относится к роду *Lyssavirus*, семейству *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales* [1]. Род *Lyssavirus* включает классический вирус бешенства (RABV), который относится к филогенетической группе 1 и распространен среди различных видов животных по всему миру [1, 2].

Бешенство занимает важное место в ряду вирусных болезней человека и животных, являясь одним из высокоопасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы, энцефаломиелиты, параличи с неизбежным летальным исходом [3, 4]. В связи с этим рабическая болезнь представляет мировую проблему в сфере инфекционной патологии, эпидемиологии, эпизоотологии и экологии [5].

В настоящее время в развитых странах, в том числе в России, где технологии изготовления вакцин отвечают современным требованиям, отказались от производства тканевых антирабических препаратов и изготавливают живые и инактивированные культуральные вакцины против бешенства для парентерального и орального применения [4].

В мире существуют разнообразные антирабические вакцины для оральной иммунизации диких плотоядных животных, однако возникают сомнения в безопасности и эффективности некоторых из них. В настоящее время ведутся разработки новых, более совершенных по данным показателям препаратов [4, 6, 7]. Эксперты и специалисты ВОЗ, МЭБ, FAO, GARC постоянно указывают на необходимость совершенствования имеющихся антирабических препаратов и разработку новых, более безопасных вакцин [4].

Противозооотические мероприятия, осуществляемые на территории Российской Федерации в последнее время, не позволяют значительно ограничить распространение бешенства среди животных [2]. В России применяются отечественные оральные антирабические вакцины для диких плотоядных животных, изготовленные с применением аттенуированного штамма вируса бешенства, позволяющего защищать от любого варианта возбудителя бешенства филогенетической группы 1 [8, 9, 10].

Эффективность профилактической вакцинации зависит от способа применения, качества выпускаемых вакцин и числа иммунизированных диких плотоядных

животных [2, 10]. Для каждого вида целевых животных эффективность вакцины должна быть доказана посредством статистически достоверного исследования при иммунизации пероральной вакциной с последующим контрольным заражением животных и оценкой протективных свойств вакцинного препарата. В опытах используют наиболее восприимчивых, молодых особей, для которых рекомендована вакцина. Значения титров антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) должны подтверждать эффективность вакцинного препарата для каждого вида целевых животных. Для этого проводят изучение выработки защитных антител в реакции нейтрализации (модификация RFFIT) [8] и продолжительности иммунитета у диких плотоядных животных [6, 7].

Производство антирабических вакцин для животных регламентировано требованиями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), в соответствии с которыми вакцина должна обеспечивать надежный иммунитет у целевых видов животных (индекс иммуногенности ≥ 1,0) и индуцировать выработку ВНА в титре не менее 0,5 МЕ/см<sup>3</sup> [4].

Цель данной работы заключалась в исследовании иммуногенных и протективных свойств антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для диких плотоядных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирус бешенства.** Для изготовления антирабической вакцины «Ферарабивак» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») использовали живой аттенуированный штамм РВ-97 вируса бешенства, который депонирован в Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Для контрольного заражения применяли штамм стандарта контрольного вируса бешенства CVS-27.

**Вакцина.** В работе использовали антирабическую живую вакцину «Ферарабивак» орального применения для диких плотоядных животных, которая содержала суспензию аттенуированного вируса бешенства штамма РВ-97 с титром инфекционной активности не ниже 6,0 lg KКID<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> в дозах 1,0; 2,0 и 5,0 см<sup>3</sup>.

**Животные.** Для исследования иммуногенных свойств вакцины использовали лисиц рыжих в возрасте 9–12 месяцев в количестве 115 голов; енотовидных собак в возрасте 9–12 месяцев в количестве 85 голов. Животных закупают в звероводческих хозяйствах

Московской области. Все опытные животные, по данным исследования в реакции нейтрализации, не имели ВНА к вирусу бешенства.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014, принятым Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2012 по охране животных, используемых в научных целях.

**Определение титра инфекционной активности вируса бешенства.** Инфекционную активность вируса бешенства определяли с применением монослойной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17) с последующим окрашиванием антирабическим иммуноглобулином G, меченным флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) [11]. Значения титра вируса бешенства вычисляли с использованием метода Спирмана-Кербера [12] и выражали в Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**Отбор проб головного мозга и крови.** При отборе проб головного мозга и крови диких плотоядных животных руководствовались «Методическими указаниями по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин», разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [13].

**Реакция иммунофлуоресценции (РИФ).** Отпечатки тканей головного мозга от целевых животных исследовали в прямом варианте РИФ, сущность которого заключается в соединении антирабических антител, меченных ФИТЦ, со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов «антитело-антиген» в полях зрения люминесцентного микроскопа [14].

**Исследование иммуногенных свойств вакцины.** Длительность сформированного иммунитета у целевых животных в конце заявленного периода защиты оценивали при анализе сывороток крови целевых животных в реакции нейтрализации (модификация FAVN) с применением монослойной клеточной линии ВНК-21/2-17 и ФИТЦ-иммуноглобулина согласно рекомендациям МЭБ по бешенству [4]. Использовали антирабический лиофилизированный сывороточный стандарт МЭБ с активностью 6,7 МЕ/см<sup>3</sup>, приготовленный из сывороток крови иммунизированных собак, и отрицательный сывороточный стандарт МЭБ, приготовленный из сывороток крови неиммунизированных собак (ANSES, Nancy, France). Исследование каждой сыворотки крови проводили в трех повторениях.

**Исследование протективных свойств вакцины.** При исследовании эффективности иммунизации использовали по 25 вакцинированных и по 10 контрольных голов целевых видов животных. Контрольное заражение проводили на 30 сут после вакцинации в дозе 25 000 LD<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. После заражения за животными наблюдали ежедневно в течение 90 сут. Как только у животных начинали проявляться клинические признаки бешенства, их подвергали эвтаназии и посредством использования РИФ подтверждали наличие вируса бешенства. В конце периода наблюдения всех выживших животных усыпляли и с использованием РИФ проводили исследования отпечатков головного мозга.

**Статистическая обработка данных.** Полученные данные статистически обрабатывали, вычисляя сред-

ние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера [12]. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак» предназначена для профилактики бешенства у диких плотоядных животных, и единственным способом иммунизации в данном случае является поедание препарата.

На первом этапе работы проводили исследование по определению иммунизирующей дозы антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» на 30 рыжих лисицах. Животные были разделены на 3 группы по 10 голов в каждой. Первой группе животных скормили по 1 приманке, содержащей 1,0 см<sup>3</sup> вакцины, второй группе – по 1 приманке, содержащей 2,0 см<sup>3</sup> вакцины, третьей группе – по 1 приманке, содержащей 5,0 см<sup>3</sup> вакцины. На 14, 21, 30 и 60 сут после вакцинации у животных отбирали кровь, полученные сыворотки исследовали на наличие антирабических ВНА. Результаты представлены в таблице 1.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что при поедании лисицами приманки, содержащей 1,0 см<sup>3</sup> вакцины, титры антирабических ВНА на 14, 21, 30, 60 сут после вакцинации составляли 0,30 ± 0,29; 0,90 ± 0,25; 1,25 ± 0,25; 2,00 ± 0,21 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. В результате поедания данного вакцинного препарата в дозе 2,0 см<sup>3</sup> количество ВНА против вируса бешенства на 14, 21, 30, 60 сут после иммунизации составляло 0,69 ± 0,18; 2,20 ± 0,23; 3,20 ± 0,34; 4,20 ± 0,38 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. При поедании препарата в дозе 5,0 см<sup>3</sup> титры антирабических ВНА на 14, 21, 30, 60 сут после вакцинации были равны 0,78 ± 0,25; 2,60 ± 0,35; 4,00 ± 0,28; 4,96 ± 0,30 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. Исходя из полученных данных, учитывая требования МЭБ и с точки зрения экономической целесообразности, эффективной иммунизирующей дозой рассматриваемой вакцины для лисиц является 2,0 см<sup>3</sup> с титром инфекционной активности не менее 6,00 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, которая обеспечивает защиту животного от заражения бешенством через 14 сут после иммунизации. При скормлении животным приманки с 5,0 см<sup>3</sup> вакцины

**Таблица 1**  
Определение иммунизирующей дозы антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных ( $n = 10, p < 0,05$ )

**Table 1**  
Determination of immunizing dose of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine for wild carnivores ( $n = 10, p < 0.05$ )

Сутки после вакцинации	Титр антирабических ВНА (МЕ/см <sup>3</sup> )* при поедании вакцины в разных дозах		
	1,0 см <sup>3</sup>	2,0 см <sup>3</sup>	5,0 см <sup>3</sup>
14	0,30 ± 0,29	0,69 ± 0,18	0,78 ± 0,25
21	0,90 ± 0,25	2,20 ± 0,23	2,60 ± 0,35
30	1,25 ± 0,25	3,20 ± 0,34	4,00 ± 0,28
60	2,00 ± 0,21	4,20 ± 0,38	4,96 ± 0,30

\* По данным реакции нейтрализации (модификация FAVN).

**Таблица 2**  
Оценка иммуногенной активности антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» на лисицах и енотовидных собаках ( $n = 25, p < 0,05$ )

**Table 2**  
Assessment of the immunogenicity of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine in foxes and raccoon dogs ( $n = 25, p < 0,05$ )

Сутки после вакцинации	Титры антирабических ВНА, МЕ/см <sup>3</sup> *	
	лисицы	енотовидные собаки
14	0,70 ± 0,18	0,73 ± 0,19
30	3,20 ± 0,22	3,50 ± 0,22
50	4,30 ± 0,32	4,53 ± 0,27
60	4,20 ± 0,40	4,30 ± 0,30
70	4,00 ± 0,29	4,09 ± 0,32
80	3,81 ± 0,42	3,90 ± 0,23
90	3,70 ± 0,35	3,80 ± 0,41

\* По данным реакции нейтрализации (модификация FAVN).

формировалось сопоставимое количество ВНА против вируса бешенства, но со значительным расходом вакцинного сырья. Использование иммунизирующей дозы в объеме 1,0 см<sup>3</sup> на 14 сут после вакцинации вызывало накопление антирабических ВНА, но недостаточное для защиты животных от бешенства ( $< 0,50$  МЕ/см<sup>3</sup>).

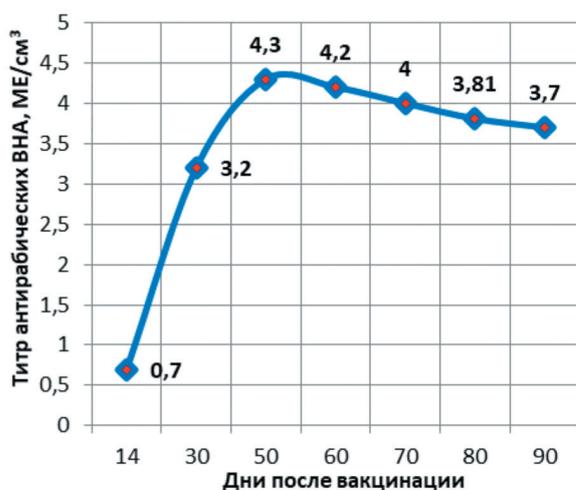
На следующем этапе исследования был проведен опыт по изучению иммуногенной активности вакцины «Ферарабивак» на 25 лисицах и 25 енотовидных собаках. Животным перорально было введено по одной дозе вакцины, содержащей 2,0 см<sup>3</sup> аттенуированного вируса бешенства с титром 6,0 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Спустя 14, 30, 50, 60, 70, 80 и 90 сут после вакцинации у животных отбирали кровь и определяли титр вирусспецифических антител в сыворотках. Результаты исследований представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что антирабическая живая оральная вакцина

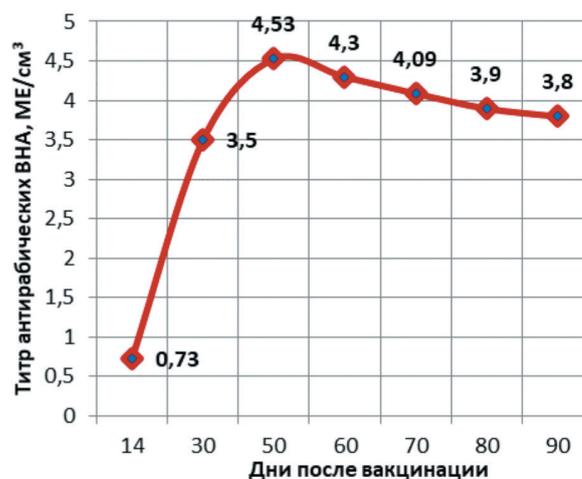
«Ферарабивак» индуцировала у животных выработку ВНА против вируса бешенства. Так, через 14 сут после оральной иммунизации антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах  $0,70 \pm 0,18$  и  $0,73 \pm 0,19$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ( $\geq 0,50$  МЕ/см<sup>3</sup>), а через 30 сут –  $3,20 \pm 0,22$  и  $3,50 \pm 0,22$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. Спустя 50 сут уровень антирабических ВНА у лисиц достигал максимальных значений и составлял  $4,30 \pm 0,32$  МЕ/см<sup>3</sup>. Далее наблюдалось снижение титра ВНА, но при этом через 90 сут он оставался на высоком уровне и составлял  $3,70 \pm 0,35$  МЕ/см<sup>3</sup>, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ( $\geq 0,50$  МЕ/см<sup>3</sup>). Уровень титров ВНА у енотовидных собак, вакцинированных препаратом «Ферарабивак», достигал максимальных значений спустя 50 сут и был равен  $4,53 \pm 0,27$  МЕ/см<sup>3</sup>, а затем постепенно снижался и через 90 сут после иммунизации составлял  $3,80 \pm 0,41$  МЕ/см<sup>3</sup>.

Для оценки протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» орального применения для диких плотоядных животных использовали 35 лисиц, которых разделили на две группы: опытную (№ 1) – 25 голов и контрольную (№ 2) – 10 голов, а также 35 енотовидных собак, которые также были разделены на опытную (№ 3) – 25 голов и контрольную (№ 4) группы – 10 голов. Животных групп № 1 и 3 иммунизировали вакциной в дозе 2,0 см<sup>3</sup>. В группах № 2 и 4 находились контрольные животные, которых не подвергали иммунизации. Перед заражением у животных отбирали кровь для определения титра антирабических ВНА. Через 30 сут после поедания препарата проводили контрольное заражение лабораторных животных контрольным штаммом CVS-27 вируса бешенства в дозе 25 000 LD<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. В течение 90 сут проводили ежедневную оценку клинического состояния животных. Результаты опыта представлены в таблицах 3 и 4.

В результате контрольного заражения все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», не проявляли клинических признаков бешенства. Средние значения титров антител против



А



Б

Рис. 1. Иммуногенная активность антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» при исследовании на лисицах (А) и енотовидных собаках (Б)

Fig. 1. Immunogenicity of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine in foxes (A) and raccoon dogs (B)

**Таблица 3**  
**Результаты заражения контрольным штаммом вируса бешенства CVS-27 лисиц через месяц после иммунизации вакциной «Ферарабивак»** ( $n_{иссл.} = 3, p < 0,05$ )

**Table 3**  
**Challenge of foxes with CVS 27 strain one month post vaccination with Ferarabivac** ( $n = 3, p < 0,05$ )

Номер группы	Номер животного	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см <sup>3</sup>	Результаты контрольного заражения	
			наличие/отсутствие клинических признаков бешенства	исследование головного мозга в РИФ
1 (опытная)	1	3,20 ± 0,21	–	отрицат.
	2	3,32 ± 0,20	–	отрицат.
	3	3,18 ± 0,24	–	отрицат.
	4	3,25 ± 0,19	–	отрицат.
	5	3,31 ± 0,20	–	отрицат.
	6	3,24 ± 0,21	–	отрицат.
	7	3,42 ± 0,25	–	отрицат.
	8	3,14 ± 0,18	–	отрицат.
	9	3,24 ± 0,27	–	отрицат.
	10	3,20 ± 0,25	–	отрицат.
	11	3,28 ± 0,21	–	отрицат.
	12	3,15 ± 0,24	–	отрицат.
	13	3,25 ± 0,21	–	отрицат.
	14	3,38 ± 0,25	–	отрицат.
	15	3,39 ± 0,20	–	отрицат.
	16	3,18 ± 0,24	–	отрицат.
	17	3,05 ± 0,19	–	отрицат.
	18	3,38 ± 0,20	–	отрицат.
	19	3,08 ± 0,21	–	отрицат.
	20	3,42 ± 0,27	–	отрицат.
	21	3,40 ± 0,19	–	отрицат.
	22	3,24 ± 0,27	–	отрицат.
	23	3,20 ± 0,27	–	отрицат.
	24	3,36 ± 0,21	–	отрицат.
	25	3,19 ± 0,24	–	отрицат.
	<i>M ± m</i>	3,26 ± 0,22		
2 (контроль)	26	0,00	+	положит.
	27	0,00	+	положит.
	28	0,00	+	положит.
	29	0,00	+	положит.
	30	0,00	+	положит.
	31	0,00	+	положит.
	32	0,00	+	положит.
	33	0,00	+	положит.
	34	0,00	+	положит.
	35	0,00	+	положит.
	<i>M ± m</i>	0,00		

«+» – наличие клинических признаков бешенства и специфическая гибель животного;  
«–» – отсутствие клинических признаков бешенства.

**Таблица 4**  
**Результаты заражения контрольным штаммом вируса бешенства CVS-27 енотовидных собак через месяц после иммунизации вакциной «Ферарабивак»** ( $n_{иссл.} = 3, p < 0,05$ )

**Table 4**  
**Challenge of racoon dogs with CVS 27 strain one month post vaccination with Ferarabivac** ( $n = 3, p < 0,05$ )

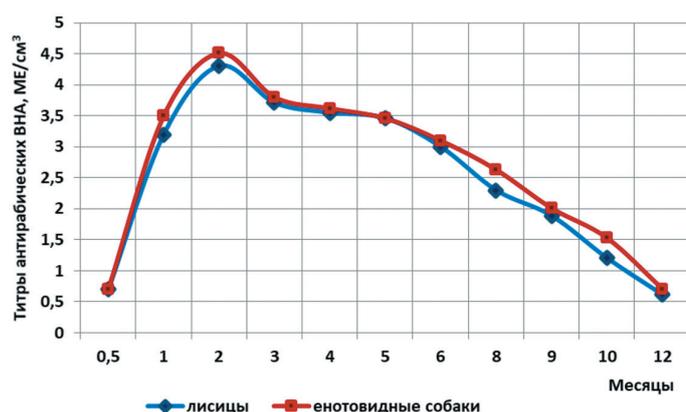
Номер группы	Номер животного	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см <sup>3</sup>	Результаты контрольного заражения	
			Наличие/отсутствие клинических признаков бешенства	Исследование головного мозга в РИФ
1 (опытная)	1	3,45 ± 0,24	–	отрицат.
	2	3,41 ± 0,21	–	отрицат.
	3	3,58 ± 0,19	–	отрицат.
	4	3,35 ± 0,19	–	отрицат.
	5	3,39 ± 0,22	–	отрицат.
	6	3,47 ± 0,21	–	отрицат.
	7	3,61 ± 0,20	–	отрицат.
	8	3,74 ± 0,26	–	отрицат.
	9	3,50 ± 0,27	–	отрицат.
	10	3,40 ± 0,25	–	отрицат.
	11	3,58 ± 0,21	–	отрицат.
	12	3,51 ± 0,24	–	отрицат.
	13	3,39 ± 0,21	–	отрицат.
	14	3,58 ± 0,25	–	отрицат.
	15	3,60 ± 0,20	–	отрицат.
	16	3,48 ± 0,24	–	отрицат.
	17	3,55 ± 0,28	–	отрицат.
	18	3,64 ± 0,20	–	отрицат.
	19	3,48 ± 0,22	–	отрицат.
	20	3,49 ± 0,27	–	отрицат.
	21	3,51 ± 0,19	–	отрицат.
	22	3,49 ± 0,27	–	отрицат.
	23	3,70 ± 0,27	–	отрицат.
	24	3,76 ± 0,21	–	отрицат.
	25	3,69 ± 0,26	–	отрицат.
	<i>M ± m</i>	3,78 ± 0,23		
2 (контроль)	26	0,00	+	положит.
	27	0,00	+	положит.
	28	0,00	+	положит.
	29	0,00	+	положит.
	30	0,00	+	положит.
	31	0,00	+	положит.
	32	0,00	+	положит.
	33	0,00	+	положит.
	34	0,00	+	положит.
	35	0,00	+	положит.
	<i>M ± m</i>	0,00		

«+» – наличие клинических признаков бешенства и специфическая гибель животного;  
«–» – отсутствие клинических признаков бешенства.

**Таблица 5**  
Исследование продолжительности иммунитета в течение 12 месяцев у диких животных, иммунизированных вакциной «Ферарабивак» ( $n_{\text{иссл.}} = 3, p < 0,05$ )

**Table 5**  
A 12-months' study of immunity duration in wild animals vaccinated with Ferarabivac ( $n = 3, p < 0.05$ )

Срок после вакцинации, месяц	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см <sup>3</sup>	
	лисицы	енотовидные собаки
0,5	0,70 ± 0,31	0,70 ± 0,29
1	3,20 ± 0,22	3,50 ± 0,22
2	4,30 ± 0,32	4,51 ± 0,27
3	3,71 ± 0,35	3,80 ± 0,41
4	3,55 ± 0,41	3,62 ± 0,25
5	3,46 ± 0,23	3,46 ± 0,35
6	3,00 ± 0,31	3,10 ± 0,43
8	2,30 ± 0,19	2,63 ± 0,23
9	1,89 ± 0,37	2,01 ± 0,19
10	1,21 ± 0,15	1,53 ± 0,25
12	0,62 ± 0,28	0,71 ± 0,17



**Рис. 2.** Длительность иммунитета против бешенства у лисиц и енотовидных собак, вакцинированных антирабической живой оральной вакциной «Ферарабивак»

**Fig. 2.** Immunity duration in foxes and raccoon dogs vaccinated with Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine

вируса бешенства через месяц после иммунизации для лисиц и енотовидных собак составили  $3,24 \pm 0,08$  и  $3,26 \pm 0,22$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. Контрольные животные пали на 12–20 сут после заражения. Специфичность падежа была подтверждена в РИФ. Наблюдение за оставшимися животными продолжалось еще в течение 90 сут после гибели последнего контрольного животного. По истечении срока наблюдения животных подвергли эвтаназии и исследовали головной мозг в РИФ. В исследованных пробах головного мозга вирус бешенства обнаружен не был.

На заключительном этапе работы проводили исследование по продолжительности иммунитета у 25 лисиц и 25 енотовидных собак, которые были вакцинированы препаратом «Ферарабивак» в дозе 2,0 см<sup>3</sup> с титром инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,0 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. В течение года за животными вели наблюдение и пе-

риодически брали пробы крови для определения наличия антирабических ВНА. Результаты исследования представлены в таблице 5 и на рисунке 2.

По результатам, представленным в таблице 5 и на рисунке 2, можно сделать вывод, что после иммунизации лисиц вакциной «Ферарабивак» ВНА против вируса бешенства обнаружены уже после однократного применения через 0,5 месяца в титре  $0,70 \pm 0,31$  МЕ/см<sup>3</sup>. Уровень антирабических антител достигал пика к 2 месяцам и составлял  $4,30 \pm 0,32$  МЕ/см<sup>3</sup>, а затем начал постепенно снижаться и через 6 месяцев составил  $3,00 \pm 0,31$  МЕ/см<sup>3</sup>, через 12 месяцев –  $0,62 \pm 0,28$  МЕ/см<sup>3</sup>.

После иммунизации енотовидных собак вакциной «Ферарабивак» антирабические ВНА обнаружены после однократного поедания через полмесяца в титре  $0,70 \pm 0,29$  МЕ/см<sup>3</sup>. Уровень антирабических антител достигал пика к 2 месяцам и составлял  $4,51 \pm 0,27$  МЕ/см<sup>3</sup>, а затем постепенно снижался и через 6 месяцев соответствовал значениям  $3,10 \pm 0,43$  МЕ/см<sup>3</sup>, через 12 месяцев –  $0,71 \pm 0,17$  МЕ/см<sup>3</sup>. Иными словами, антирабическая живая вакцина «Ферарабивак» обеспечивала защиту диких плотоядных животных от бешенства в течение 12 месяцев, поскольку титр антирабических ВНА был  $\geq 0,5$  МЕ/см<sup>3</sup>, что соответствует требованиям МЭБ, предъявляемым к антирабическим вакцинам [4]. Минимальный пороговый уровень ВНА определен через 12 месяцев после иммунизации, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных.

Определено, что оптимальная иммунизирующая доза препарата составляет 2,0 см<sup>3</sup> с титром инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,00 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Выявлено, что через 14 сут после оральной иммунизации данной вакциной антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах  $0,70 \pm 0,18$  и  $0,73 \pm 0,19$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ( $\geq 0,50$  МЕ/см<sup>3</sup>). Спустя 50 сут уровень антирабических ВНА у лисиц достигал максимальных значений и составлял  $4,30 \pm 0,32$  МЕ/см<sup>3</sup>. Далее наблюдалось снижение титра ВНА, но при этом через 90 сут он оставался на высоком уровне и составлял  $3,70 \pm 0,35$  МЕ/см<sup>3</sup>. Титр ВНА у енотовидных собак, вакцинированных препаратом «Ферарабивак», достигал максимальных значений спустя 50 сут и был равен  $4,53 \pm 0,27$  МЕ/см<sup>3</sup>, а затем постепенно снижался и через 90 сут после иммунизации составлял  $3,80 \pm 0,41$  МЕ/см<sup>3</sup>. Минимальный пороговый уровень ВНА определен через 12 месяцев после иммунизации и составлял у лисиц и енотовидных собак  $0,62 \pm 0,28$  и  $0,71 \pm 0,17$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год.

Установлено, что в результате контрольного заражения через 30 сут после вакцинации все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», в течение всего срока наблюдения не проявляли клинических признаков бешенства. Средние значения титров антител против вируса бешенства через месяц после иммунизации у лисиц и енотовидных собак

составили  $3,24 \pm 0,08$  и  $3,26 \pm 0,22$  МЕ/см<sup>3</sup> соответственно. Контрольные животные пали на 12–20 сут после заражения. Специфичность падежа была подтверждена в РИФ. Наблюдение за оставшимися животными продолжалось еще в течение 90 сут после гибели последнего контрольного животного. По истечении срока наблюдения животных подвергли эвтаназии и подтвердили в РИФ отсутствие вируса бешенства в тканях головного мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 4, 5, 7, 10 см. REFERENCES)

1. Чупин С. А., Доронин М. И., Чернышова Е. В., Шульпин М. И. Генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Владимирской области. *Ветеринария сегодня*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872.
2. Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 394 с.
3. Макаров В. В., Лозовой Д. А., Брико Н. И. Бешенство рукокрылых и человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 6: 46–53. eLIBRARY ID: 25134001.
4. Рыбаков С. С., Белик Е. В., Метлин А. Е., Борисов В. В., Назаров Н. А., Егоров А. А., Чернышова Е. В., Михалишин В. В. Безопасность и иммуногенность оральных антирабических вакцин. *Ветеринария*. 2010; 8: 18–22. eLIBRARY ID: 15198430.
5. Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT) (МУ 37-16). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. 19 с.
6. Гусев А. А., Авилов В. М., Бабак В. А., Пунтус И. А., Смаилова А. С. Экспериментальный метод оценки иммуногенности живой вакцины против бешенства диких животных. *Ветеринария Кубани*. 2019; 3: 7–9. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-3-7-9.
7. Метлин А. Е., Рыбаков С. С., Михалишин В. В., Muller T. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства. *Ветеринария*. 2009; 8: 18–25. eLIBRARY ID: 12930952.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. д-ра физ.-мат. наук Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузикашвили, Д. В. Самойлова. М.: Практика; 1999. 459 с.
9. Чернышова Е. В., Сухарьков А. Ю., Метлин А. Е., Белик Е. В., Назаров Н. А., Чепуркин А. В., Рыбаков С. С. Методические указания по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2010. 23 с.
10. Методические указания для диагностики бешенства животных в реакции иммунофлуоресценции: утв. Россельхознадзором 13.09.2017 (МУ 33-17). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2017. 14 с.

## REFERENCES

1. Chupin S. A., Doronin M. I., Chernyshova E. V., Shulpin M. I. Genetic characterization of rabies virus isolates detected in the territory of the Vladimir Oblast. *Veterinary Science Today*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872. (in Russian)
2. Gruzdev K. N., Metlin A. E. Animal Rabies. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019. 394 p. (in Russian)

3. Makarov V. V., Lozovoy D. A., Briko N. I. Cheiropter rabies and man. *Epidemiology and infectious diseases. Current items*. 2015; 6: 46–53. eLIBRARY ID: 25134001. (in Russian)
4. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris; 2018; Chap. 3.1.17: 578–612. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.17\\_RABIES.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf).
5. Fooks A. R., Banyard A. C., Horton D. L., Johnson N., McElhinney L. M., Jackson A. C. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet*. 2014; 384 (9951): 1389–1399. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.
6. Rybakov S. S., Belik E. V., Metlin A. E., Borisov V. V., Nazarov N. A., Egorov A. A., Chernyshova E. V., Mikhailishin V. V. Safety and immunogenicity of oral anti-rabies vaccines. *Veterinariya*. 2010; 8: 18–22. eLIBRARY ID: 15198430. (in Russian)
7. Freuling C. M., Eggerbauer E., Finke S., Kaiser C., Kaiser C., Kretzschmar A., Nolden T., Ortmann S., Schröder C., Teifke J. P., Schuster P., Vos A., Mettenleiter T. C., Müller T. Efficacy of the oral rabies virus vaccine strain SPBN GASGAS in foxes and raccoon dogs. *Vaccine*. 2019; 37 (33): 4750–4757. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.093.
8. Guidelines for determining the rabies virus neutralizing antibody level in the blood sera of wild carnivorous animals by VNT in BHK-21 cell culture (RFFIT) (МУ 37-16) [Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu virusnejtralizuyushchih antitel k virusu beshenstva v syvorotkakh krovi dikih plotoyadnykh zhivotnykh v reakcii nejtralizatsii v kul'ture kletok VNK-21 (RFFIT) (МУ 37-16)]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2016. 19 p. (in Russian)
9. Gusev A. A., Avilov V. M., Babak V. A., Puntus I. A., Smailova A. S. Experimental method for immunogenicity evaluation of live vaccines against rabies in wild animals. *Veterinaria Kubani*. 2019; 3: 7–9. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-3-7-9. (in Russian)
10. Müller T. F., Schuster P., Vos A. C., Selhorst T., Wenzel U. D., Neuberger A. M. Effect of maternal immunity on the immune response to oral vaccination against rabies in young foxes. *Am. J. Vet. Res.* 2001; 62 (7): 1154–1158. DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1154.
11. Metlin A. E., Rybakov S. S., Mikhailishin V. V., Muller T. Oral vaccination of wild carnivorous animals against rabies. *Veterinariya*. 2009; 8: 18–25. eLIBRARY ID: 12930952. (in Russian)
12. Glants S. Medico-biological statistics: translated from English. Dr. of Sciences (Physics and Mathematics) Yu. A. Danilova; ed. by N. E. Buzikashvili, D. V. Samoilov. M.: Practice; 1999. 459 p. (in Russian)
13. Chernyshova E. V., Sukharkov A. Yu., Metlin A. E., Belik E. V., Nazarov N. A., Chepurkin A. V., Rybakov S. S. Methodological guidelines for the selection and transfer of brain samples, blood sera and bone tissue to diagnose animal rabies and assess the effectiveness of oral rabies vaccines [Metodicheskie ukazaniya po otboru i peresylke prob golovnoogo mozga, syvorotok krovi i kostnoj tkani s cel'yu diagnostiki beshenstva zhivotnykh i ochenki effektivnosti oral'nykh antirabicheskikh vakcin]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2010. 23 p. (in Russian)
14. Guidelines for animal rabies diagnosis using immunofluorescence test [Metodicheskie ukazaniya dlya diagnostiki beshenstva zhivotnykh v reakcii immunofluorescencii]: approved by the Rosselkhoz nadzor 13.09.2017 (МУ 33-17). Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2017. 14 p. (in Russian)

Поступила 13.01.20

Принята в печать 14.02.20

Received on 13.01.20

Approved for publication on 14.02.20

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Шишков Александр Валерьевич**, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Лозовой Дмитрий Анатольевич**, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Борисов Алексей Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Михалишин Дмитрий Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Alexander V. Shishkov**, Leading Veterinarian of the Laboratory for FMD Prevention FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry A. Lozovoy**, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Alexey V. Borisov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher of the Laboratory for FMD Prevention of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry V. Mikhailishin**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Laboratory for FMD Prevention of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.