

УДК 619:616.371:616.98:578.824.11:578.822.2

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН Беларуси  
 Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАСХН  
 Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук  
 Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук  
 Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н. Вышелесского», г. Минск

## РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ ЖИДКОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СОРБИРОВАННОЙ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА И ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК «ПАРВОРАБ»

### Резюме

Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает смешанные в равных объемах вирус бешенства штамм «КМИЭВ-94» в титре 6,8–7,0 lg, выращенный в культуре клеток ВНК-21, и вирус ПВЭС КМИЭВ-14 в титре 7,0–8,0 log<sub>2</sub>, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вирусов – теотропин в 0,1%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

### Summary

The vaccine consist equal volume rabies virus strain KMIEV-94, growth cell culture BHK-21 with titer 6,8–7,0 lg and Canine parvovirus KMIEV-14B growth cell culture CrFK, with titer 6,8–7,0 lg. Virus parts are inactivated with Teotropin with 0,1 % concentration. Vaccine is adjuvanted by Hydro oxide alumina 10 vol %.

### ВВЕДЕНИЕ

Бешенство и парвовирусный энтерит собак являются одними из наиболее распространенных вирусных инфекций плотоядных животных, которые наносят значительный экономический ущерб и представляют социальную опасность.

Бешенство – исключительно опасное, абсолютно смертельное заболевание всех теплокровных животных и человека. Заболевание имеет широкое распространение во многих странах мира, в т.ч. и в Беларуси.

В Беларуси напряженность эпизоотической обстановки по бешенству начинает возрастать с 1996г. Если в 1995г. на территории республики было выявлено 14 случаев заболевания, то в 1999г. лабораторный диагноз на бешенство подтвержден уже у 130, в 2002г. – у 832, 2003г. – у 1143, 2006г. – у 1614, 2008г. – у 1053, 2009г. – у 991, и в 2010г. (за 6 месяцев) – у 408 животных.

Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей, так как обращаемость населения в связи с покусами, оцарапываниями и ослонениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 28000 случаев в год. В 2000 – 2006гг. отмечены 4 случая гибели от

бешенства людей [4, 5, 7, 14].

В ветеринарной практике в настоящее время применяются как живые тканевые и культуральные, так и инактивированные антирабические вакцины. В 90-х годах 20-го столетия для животных изготовлялось 84 разновидности антирабических вакцин в 41 стране мира. Из них 30 типов вакцин – живые аттенуированные, остальные 54 – это вакцины, содержащие в своем составе инактивированный разными способами вирус [14].

Живые аттенуированные вакцины готовят, как правило, на основе культур клеток (почка сирийского хомячка, ВНК-21, VERO, почки поросенка, почки сайги и др.) или развивающихся куриных эмбрионов.

В России, как и во многих других странах, парентеральное применение живых антирабических вакцин в настоящее время запрещено. Производятся и используются для ветеринарных целей следующие инактивированные культуральные вакцины:

- вакцина из штамма «Внуково-32», выращенного в культуре клеток ВНК-21 с использованием питательной среды Игла и адьюванта β-пропиолактона [1];

- вакцина из штамма вируса бешенст-

ва «Щелково-51», выращенного в перевиваемой культуре клеток ВНК-21, клон13 на среде Игла и инактивированного  $\beta$ -пропиолактоном [10];

- вакцина из штамма вируса бешенства «ТС-80», выращенного в суспензии клеток ВНК-21 с использованием питательной среды Игла-МЕМ и инактивированного сернокислой медью или теотропином А-24 [2];

- вакцина из штамма «РБ-97» (дериват штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ»), выращенного в суспензии клеток ВНК-21 с использованием инактиванта димерэтиленимина [3].

В Беларуси РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработана и производится жидкая культуральная сорбированная инактивированная вакцина из штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» и его модификации КМИЭВ-94 [6, 7].

Существенный удельный вес в инфекционной патологии плотоядных животных занимает и парвовирусный энтерит собак (ПЭС). Кроме собак им могут болеть кошки, лисицы, еноты, песцы, норки и другие животные.

Парвовирусная инфекция собак, которая впервые была зарегистрирована в 1976г. в Бельгии, в настоящее время широко распространена во многих странах мира. Заболевание подвержены как молодые, так и взрослые животные. Наибольшую опасность она представляет для щенят в возрасте до 6 месяцев – летальность составляет от 25 % до 80 % [12, 13, 15]. Хотя официальной статистики по указанному заболеванию в Республике Беларусь не ведется, косвенные источники (объемы вакцинаций) позволяют судить о его значительном распространении.

Надежным способом профилактики парвовирусного энтерита собак является вакцинация. Для этой цели используются инактивированные и живые аттенуированные вакцины [13, 15].

Из инактивированных вакцин в странах СНГ в настоящее время используют препарат «Биовак Д» из штамма «Геркулес», препарат фирмы «Ветзвероцентр» из штамма «Д» (в моновалентном виде и как компонент ассоциированных вакцин).

У привитых инактивированными вакцинами собак наибольшая напряженность гуморального иммунного ответа достигается че-

рез 1–2 недели после двукратной вакцинации и сохраняется до года [15].

Живые вакцины против парвовирусного энтерита собак готовят из аттенуированных штаммов ПВС или вируса панлейкемии кошек. Для этой цели применяют моновалентные вакцины из ПВС ЗАО «Фирма Ветзвероцентр», «Вангард Puppy CPV» (Пфайзер), «Биовак Д» (ООО «Биоцентр»), «Нобивак Парво-С» (Интервет), «Квантум Р» (Питман-Мур), «Коммандер Parvo MLV» (Биокар), «Неомар» (Неотех) и др. [15].

После двукратного введения живых вакцин у 92% привитых собак обеспечивается иммунитет продолжительностью до года.

В связи с тем, что бешенство и парвовирусный энтерит собак весьма контагиозны и повсеместно имеют широкое распространение, действенным способом их профилактики является практически поголовная вакцинация указанных животных. Так, в Беларуси против бешенства ежегодно вакцинируется до 700 тыс. собак. Примерно такое же количество животных вакцинируется и против парвовирусного энтерита (хотя точные данные отсутствуют).

Поскольку отдельная вакцинация собак против этих инфекций связана с техническими трудностями и требует значительных затрат труда и времени, в ряде стран были предприняты исследования по конструированию против них бивалентных вакцин, а также поливалентных с включением других вирусных, бактериальных и грибковых компонентов. В России ОАО «Росбиопром» производятся такие вакцины под названием «Мультикан-2», «Мультикан-4», «Мультикан-6», «Мультикан-7», «Мультикан-8» и др. В Беларуси указанные вакцины не производятся, а закупаются в России и других странах (Голландия, Франция). Поэтому разработка и налаживание производства отечественных вакцин против наиболее распространенных заболеваний плотоядных, в частности бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита собак, имеет важное экономическое значение и позволит сократить затраты на закупку за рубежом аналогичного препарата.

Целью наших исследований было конструирование бивалентной жидкой культуральной инактивированной сорбированной вак-

цины против бешенства и парвовирусного энтерита собак и разработке рациональной технологии ее производства.

Для реализации указанной цели решались следующие задачи:

1 Изыскание рациональных способов получения вирусного сырья для изготовления вакцины.

2 Отработка методов и режимов инаktivации вирусов.

3 Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине.

4 Конструирование вакцины и изучение ее безвредности, стерильности и иммуногенности.

5 Изучение срока годности вакцины.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в отделе вирусных инфекций РУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского», а также виварии ГУО «Белорусский государственный медицинский университет».

#### *Подопытные животные*

Исследования проводили на белых мышках и кроликах. Нелинейных белых мышей получали из вивария ГУО «Белорусский государственный медицинский университет» и, частично, из вивария РУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского». Для титрации вируса брали мышцей массой 15–17 г, а для постановки реакции нейтрализации (РН) – массой 8–10 г. Для определения иммунизирующей дозы монокомпонентов использовали кроликов породы Шиншилла, преимущественно самцов, массой 2–3 кг.

#### *Штаммы вирусов*

Фиксированный вирус бешенства штамм «КМИЭВ-94» был селекционирован в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» из штамма «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» и адаптирован к культурам клеток Vero, ПС, ВНК-21.

Вирус парвовирусного энтерита собак штамм «КМИЭВ-14» селекционирован из выделенного от собак эпизоотического штамма и адаптирован к культурам клеток CRFK и МДСК.

Эталонный фиксированный вирус бешенства штамм «CVS» в виде мозговой культуры получен в лаборатории профилактики бешенства «Института полиомиелита и вирус-

ных энцефалитов» АМН СССР. В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» вирус адаптирован к культурам клеток Vero и РЭК.

#### *Биопрепараты*

При изучении иммунологической эффективности сконструированной бивалентной вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита собак животных с целью контроля иммунизировали коммерческой вакциной производства ОАО «Росбиопром» «Мультикан-8» (против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства).

Для исследований на бешенство мозга животных, а также для титрации вируса бешенства и определения титров антирабических антител в RFFIT использовали антирабический гамма-глобулин «Biorad» французского производства.

Для выявления и титрования вируса парвовирусного энтерита собак использовали диагностические наборы Парво-тест и ИФА производства компании «Нарвак» (Россия).

#### *Культуры клеток*

Для культивирования фиксированного вируса бешенства использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/13, для культивирования вируса парвовирусного энтерита собак – культуру клеток CRFK.

#### *Фармпрепараты*

Для инаktivации вакцинных вирусов использовали теотропин по ТУ 31004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, в качестве адьюванта – гидроксал по ГОСТ 18287.

#### *Титрация вирусов и определение титров антител*

Титрацию вируса бешенства и антирабических антител проводили частично в культуре клеток, частично – на белых мышках.

Титрование вируса бешенства и реакцию нейтрализации для определения титров вируснейтрализующих антител на белых мышках, а также титрование вируса и определение титров антирабических антител методом

RFFIT проводили общепринятыми методами [8].

Титрацию вируса парвовирусного энтерита собак проводили в РГА со свинными эритроцитами и с помощью ИФА, титрацию антител к парвовирусу – в РТГА с этими же эритроцитами с 4–8 гемагглютинирующими единицами вируса по общепринятым методам [8].

Определение контаминации вирусных материалов и вакцины бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196–197, 2000–2001.

На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

#### *Определение безвредности вакцины*

Объединенную пробу из двух флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины в объеме по 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней. Результаты учитывали по отсутствию местных реакций и выживаемости животных.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### *1 Получение вирусного сырья для изготовления вакцины*

Промышленное культивирование клеток ВНК-21 и вакцинного вируса бешенства штамм «КМИЭВ-94» проводили на биореакторе Bio Flo 5000 (США). Оптимальная посевная концентрация клеток составляла 700–1000 тыс./мл, а конечная концентрация – 2,1–2,6 млн./мл. Сохранение живых клеток достигало 90–98%. В качестве питательной среды использовали среды Игла и Игла МЕМ с добавлением 10%-й сыворотки крови крупного рога скота. Подача очищенного воздуха, питательной среды и поддержание уровня рН 7,2 осуществлялась после настройки в автоматическом режиме. Температура жидкости –  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Интенсивность размножения клеток в динамике контролировали на 3 и 4 сутки путем отбора проб и проверки на концентрацию, состояние структуры, стерильность и контаминацию микрофлорой. Одновременно клетки ВНК-21/13 выращивали на роллерной установке Wheatom science products 349005-С

и исследовали по вышеуказанным показателям. Исследования проводили в трех повторностях.

С целью репродукции вакцинного вируса бешенства, в клетках ВНК-21/13 в биореактор одновременно с клетками вносили вирус штамм «КМИЭВ-94», в количестве  $0,6 \pm 0,14$  ТКИД<sub>50</sub>/кл.

Через 3 и 4 суток культивирования при температуре  $+ 37^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании и поддержании рН 7,2–7,4 вирусосодержащую суспензию проверяли на бактериальную контаминацию и титровали на белых мышках или на культуре клеток. Исследования проводили в течение трех последовательных пассажей.

Параллельно репродуцировали вакцинный штамм вируса в клетках ВНК-21/13 на роллерной установке.

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 роллерные флаконы по 200,0 см<sup>3</sup>, вносили вирус в количестве 0,1–0,6 LD<sub>50</sub>/кл. Температура питательной среды –  $(+ 37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , скорость вращения флаконов от 12 до 28 об/мин. Сбор урожая проводили на 3–4 сутки. Конечный слив вирусосодержащей суспензии проверяли на стерильность и титр вируса.

Культивирование вируса парвовирусного энтерита собак на культуре клеток CRFK со средой Игла проводили в статических условиях в 1,5 литровых матрасах и в двухлитровых роллерах при температуре  $+ (37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Заражающая доза вируса составляла 0,0005 ГАЕ/кл. Вирус вносили одновременно с клетками. Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. Урожай собирали через 3–4 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость матрасы и роллеры замораживали при температуре минус  $18–20^\circ\text{C}$  в течение 18 и более часов.

Всего получено по 5,0 литров суспензии вируса бешенства и вируса парвовирусного энтерита собак. Оба вирусных материала не

были контаминированы бактериальной и грибковой флорой.

Наибольшее накопление вакцинного вируса бешенства происходило на культуре клеток ВНК-21 при реакторном способе культивирования (титр  $7,0 \pm 0,2 \lg$ ), а ПВЭС – на культуре клеток CRFK при рол-

лерном способе культивирования ( $8,0 \pm 0,25 \log_2$ ).

Существенной разницы в титрах вирусов через 3 и 4 суток культивирования не выявлено (таблица 1).

Таблица 1 – Накопление вируса бешенства штамм «КМИЭВ-94» и вируса парвовирусного энтерита собак (ПВЭС) штамм КМИЭВ-14в при различных способах культивирования

№ п/п	Наименование вирусов	Наименование культур клеток	Титр вируса при культивировании		
			реакторным способом	роллерным способом	в статических условиях
1	Вирус бешенства КМИЭВ-94	ВНК-21	$7,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,25$	–
2	Вирус ПВЭС КМИЭВ-14в	CRFK	–	$8,0 \pm 0,25$	$7,0 \pm 0,2$

Примечания:

1 «-» означает исследования не проводились

2 Титр вируса бешенства указан в  $\lg$ , титр ПВЭС - в  $\log_2$

3 Титрацию вирусов проводили через 3 и 4 суток культивирования

### 2 Отработка метода и режима инактивации вирусов

Для инактивации вирусов использовали теотропин, ТУ 93-10-042-00495549-М, производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (г.Москва). Препарат добавляли к вирусной суспензии до конечной концентрации 0,05; 0,1 и 0,15% и выдерживали в термостате при температуре + 37°C, периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность: вирус бешенства – путем интрацеребральной инокуляции белым мышам в дозе 0,03 мл, вирус ПВЭС – путем заражения культуры клеток CRFK в дозе 4–8 ГАЕ на пробирку. Опыт повторяли три раза.

В результате было установлено, что теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре + 37°C полностью инактивировал оба вируса. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титры вирусов (таблица 2).

В дальнейшей своей работе для инактивации вакцинных вирусов бешенства и ПВЭС мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина.

### 3 Определение оптимальной концентрации гидроксала для конструирования вакцины

С целью определения использования оптимальной концентрации гидроксала в бивалентной вакцине в культуральные жидкости вируса бешенства и вируса ПВЭС добавляли гидроксал в концентрации 5% и 10%. Затем смесь вирусов с различной концентрацией гидроксала выдерживали, помешивая, в течение 18 часов в холодильнике при температуре 4°C и центрифугировали при 4000 об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную жидкость вируса бешенства титровали на белых мышках, вируса ПВЭС – в РГА. Для контроля за сорбцией вируса титрации одновременно подвергали и исходные вирусы без добавления гидроксала. Оптимальной считалась та концентрация гидроксала, при которой он максимально сорбировал вирус. Опыт повторяли три раза.

Как видно из таблицы 3, оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции обоих вирусов является 10 об %. Титр вируса бешенства при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на  $3,55 \lg$ , титр вируса ПВЭС – на  $6,0 \log_2$ .

В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

Таблица 2 – Биологическая активность вирусов бешенства и парвовирусного энтерита собак после инактивации теотропином

№ п/п	Концентрация теотропина, %	Титр вируса до инактивации	Время инактивации, часов	Титр вируса после инактивации
Вирус бешенства				
1	0,05	6,5±0,2	12	6,1±0,2
2	0,1	6,9±0,3		5,0±0,1
3	0,15	6,2±0,2		4,0±0,1
4	0,05	6,8±0,1	24	1,8±0,1
5	0,1	6,6±0,2		0
6	0,15	6,5±0,2		0
7	0,05	6,1±0,1	36	1,5±0,1
8	0,1	6,2±0,1		0
9	0,15	6,5±0,2		0
Вирус ПВЭС				
1	0,05	8,0±0,5	12	7,0±0,5
2	0,1	8,0±0,5		6,0±0,5
3	0,15	8,0±0,5		4,0±0,5
4	0,05	7,0±0,5	24	3,0±0,5
5	0,1	7,0±0,5		0
6	0,15	7,0±0,5		0
7	0,05	9,0±0,5	36	2,0±0,5
8	0,1	9,0±0,5		0
9	0,15	9,0±0,5		0

Примечание – Титры антител к вирусу бешенства указаны в lg, к вирусу ПВЭС – в log<sub>2</sub>

Таблица 3 – Титры вируса бешенства и вируса ПВЭС в надосадочной жидкости после сорбции их гидроксалом различной концентрации

№ п/п	Количество гидроксала в смеси с вирусом, %	Время сорбции, часы	Температура сорбции, °С	Титры вируса в надосадочной жидкости
Вирус бешенства				
1	5	18	4	4,3±0,1
2	10	18	4	3,2±0,1
3	Вирус без гидроксала			6,75±0,2
Вирус ПВЭС				
1	5	18	4	4,0±0,01
2	10	18	4	2,0±0,01
3	Вирус без гидроксала			8,0±0,02

Примечание – Титры вируса бешенства указаны в lg, вируса ПВЭС – в log<sub>2</sub>

*4 Конструирование вакцины жидкой культуральной инактивированной сорбированной против бешенства и парвовирусного энтерита собак*

Первоначальные исследования были посвящены определению рациональных иммунизирующих доз монокомпонентов для бивалентной вакцины против бешенства и ПВЭС.

В опыт было взято 5 групп кроликов, по

три в каждой. Всех животных иммунизировали инактивированными вирусами с 10% гидроксала. Первой группе животных ввели смесь антигена вируса бешенства в объеме 0,5 см<sup>3</sup> и вируса ПВЭС в объеме 1,0 см<sup>3</sup>, второй – смесь антигена вируса бешенства в объеме 1,0 см<sup>3</sup> и вируса ПВЭС в объеме 0,5 см<sup>3</sup>, третьей – смесь антигенов обоих вирусов в объеме по 1 1,0 см<sup>3</sup>. Четвертой груп-

пе животных с целью контроля ввели только один антиген вируса бешенства в объеме 1,0 см<sup>3</sup> и пятой – один антиген вируса ПВЭС в таком же объеме.

Через 14 и 28 дней после иммунизации

от животных были получены пробы крови и определен титр антител против вируса бешенства и вируса ПВЭС.

Результаты опыта представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения оптимальных иммунизирующих доз монокомпонентов в бивалентной вакцине против бешенства и парвовирусного энтерита собак

№ п/п	Компоненты вакцины	Объем, см <sup>3</sup>	Количество кроликов	Титры антител в дни после вакцинации		
				0	14	28
1	Вирус бешенства + вирус ПВЭС	0,5 + 1,0	3	0	20/64	40/256
2	«-»	1,0 + 0,5	3	0	40/32	80/128
3	«-»	1,0 + 1,0	3	0	40/64	80/256
4	Вирус бешенства	1,0	3	0	40	80
5	Вирус ПВЭС	1,0	3	0	64	256

Примечания:

1 Титры антител указаны в обратных величинах

2 Числитель – титры антител к вирусу бешенства, знаменатель – к вирусу ПВЭС

Как видно из таблицы, при введении смеси монокомпонентов конструируемой бивалентной вакцины против бешенства и ПВЭС серонегативным кроликам у всех животных получен положительный иммунный ответ уже к 14 дню после введения. Следует отметить, что животные, получившие смесь компонентов вакцины в равных соотношениях по 1,0 см<sup>3</sup>, имели более выраженную сероконверсию к обоим вирусам, чем животные, получившие смесь компонентов в соотношениях 0,5 + 1,0 и 1,0 + 0,5 см<sup>3</sup>. К 28 дню после иммунизации вышеуказанные животные имели защитные титры антител против обоих вирусов. Интерференции между антигенами в смеси не происходило, так как аналогичные титры антител отмечены при раздельном введении монокомпонентов. При подкожной инъекции животным компонентов вакцины в местах их введения припухлостей и болезненности в течение всего опыта не отмечалось. Таким образом, наиболее оптимальным соотношением компонентов вируса бешенства и вируса ПВЭС в бивалентной вакцине является 1:1.

Исходя из вышеуказанного, для конструирования бивалентной вакцины против бешенства и ПВЭС были взяты антигены вируса бешенства и парвовирусного энтерита в соотношении 1:1 с титрами вирусов до инактивации 6,75lg и 8,0 log<sub>2</sub> соответственно. В качестве инактивирующего вещества применяли теотропин в 0,15%-ной concentra-

ции. В качестве адьюванта для инактивированной бивалентной вакцины использовали гидроксал в концентрации 10 об %. Приготовленный образец бивалентной вакцины не был контаминирован грибковой и микробной микрофлорой (посевы на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуро отрицательны).

При подкожном введении вакцины по 0,5 см<sup>3</sup> 10 белым мышам массой 15–16 г не отмечено местных реакций и животные остались здоровыми в течение 10 дней наблюдения, что свидетельствует о безвредности препарата.

#### *5 Изучение срока годности жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства и ПВЭС*

Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре + 10°С.

При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 24 месяцев. Однако иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения снижалась. Поэтому в условиях хранения при температуре 4–10°С оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 5).

Таблица 5 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства и ПВЭС через различные сроки хранения (n-3)

№ п/п	Показатели	Сроки хранения, месяцев			
		6	12	18	24
1	Иммуногенная активность	183,4±1,13/8,0	140±1,07/8,0	115±1,07/7,0	85±1,2/5,0
2	Стерильность	+	+	+	+
3	Безвредность	+	+	+	+

Примечания:

1 «+» – положительный результат

2 Числитель – титры антител к вирусу бешенства в обратных величинах, знаменатель – титры антител к вирусу ПВЭС в log<sub>2</sub>

### ВЫВОДЫ

1 Сконструированная вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против бешенства и парвовирусного энтерита собак «Парвораб» в качестве вирусосодержащего материала включает смешанные в равных объемах вирус бешенства штамм «КМИЭВ-94» в титре 6,8–7,0 lg, выращенный в культуре клеток ВНК-21, и вирус ПВЭС «КМИЭВ-14» в в титре 7,0–8,0 log<sub>2</sub>, выращенный в культуре клеток CRFK, в качестве инактиватора вирусов – теотропин в 0,15%-ной концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

2 Для производства вакцины отработаны способы репродукции вируса бешенства реакторным и роллерным способами. При биореакторном репродукции вирус вносят в биореактор с клетками ВНК-21/13 на среде Игла с 10% сывороткой крупного рогатого скота в количестве 0,6 ± 0,14 ТКИД<sub>50</sub>/кл и культивируют при постоянном помешивании при температуре + 37<sup>0</sup>С и поддержании рН 7,2 – 7,4 в течении 3–4 суток. При роллейром репродукции – в среду Игла с клетками ВНК-21/13 в количестве 0,1–1,2 млн/мл, разлитую в роллейрные флаконы по 200,0 см<sup>3</sup>,

вносят вирус в количестве 0,1– 0,6 LD<sub>50</sub>/кл. Культивируют вирус при температуре + 37<sup>0</sup>С и скорости вращения флаконов 18–20 об/мин в течение 3–4 суток. Перед сливом вирус содержащей жидкости флаконы для разрушения клеток подвергают замораживанию и оттаиванию.

3 Вирус ПВЭС репродуцируют на культуре клеток CRFK со средой Игла и 10% сывороткой крови крупного рогатого скота в статических условиях, в 1,5 литровых матрасах или в 2-х литровых роллерных флаконах при температуре + 37<sup>0</sup>С. Заражающая доза вируса 0,0005 ГАЕ /кл. Урожай собирают через 3–4 суток культивирования после предварительного замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

4 Вирусное сырье инактивируют теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре + 37<sup>0</sup>С, смешивают в равных объемах и добавляют гидроксал.

5 Разработанная вакцина «Парвораб» является безвредным, стерильным и иммуногенным препаратом.

6 Хранение при температуре 4–10<sup>0</sup>С обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

### ЛИТЕРАТУРА

1 Barth, R., Franke, V., Selimov, M.A. Vnuko-vo-32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans. //Laboratory Techniques in Rabies. Word Health Organization, Geneva 1996. – P.310–313.

2 Вишняков, И.Ф. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства/ И.Ф. Вишняков [и др.] // Ветеринария. – 1998. – №1. – С.22–24.

3 Гочмуралов, М.Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных: автореф. дис. канд. вет. наук. – Владимир, 1999. – 33 с.

4 Зибицкер, Д.Е., Ковалев, Н.А. Бешенство и его профилактика/ Д.Е. Зибицкер [и др.] – Мн., «Уралджай», 1970. – 200 с.

5 Ковалев, Н.А. Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси/ Н.А. Ковалев [и др.]// Ветеринарная медицина Беларуси. – 2002г. – №3, – С. 4–5.

6 Ковалев, Н.А. Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства/ Н.А. Ковалев [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2007. – № 2. – С. 80–87.

7 Ковалев Н.А., Бучукури Д.В. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы// Ветеринарная наука производству: научные труды, выпуск 40: материалы научно-практической конференции «Основные патологии животных и современные технологии профилактики болезней» в честь 80-летия НАН Беларуси. – Гродно, 2008. – Т. 2. – С. 80–87.

8 Методы лабораторных исследований по бешенству. – Женева, ВОЗ, 1975. – 353 с.

9 Назаров, В.П. Бешенство животных. – М., Сельхозгиз, 1961. –160 с.

10 Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г. Кузнецов Н.Н. [и др.] Способ получения антирабической вакцины.

11 Селимов, М.А. Бешенство. – М., 1978. – 336 с.

12 Сулимов, А.А. Парвовирусный энтерит собак/А.А. Сулимов [и др.]. – М., 1984.

13 Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных/ В.Н. Сюрин [и др.]// – М., ВНИТИБП, 1988. – 928 с.

14 Таршис, М.Г. Бешенство животных/М.Г. Таршис [и др.] – Мн.: «Уралджай», 1990. – 168 с.

15 Шуляк, Б.Ф. Вирусные болезни собак.– М., 2004.