

УДК 619:616.371:616.98:[578.824.11:578.831.2:578.822.2]

**РАЗРАБОТКА И КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУМЫ,
ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО
ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Н.А. Ковалев¹, М.М. Усеня¹, П.А. Красочко¹, Д.В. Бучукури¹,
Л.В. Бутько²**

¹ – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелеского»,

г. Минск, Республика Беларусь

² – ГУО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. В статье представлены результаты разработки и испытания эффективности вакцины «ТЕТРАВАК» жидкой культуральной инактивированной сорбированной против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных животных содержащей в равных объемах инактивированные вируса бешенства - штамм КМИЭВ-94, вируса чумы плотоядных – штамм КМИЭВ -14В, вируса парвовирусного энтерита – штамм КМИЭВ 12В и инфекционного гепатита – штамм КМИЭВ-83.

Вакцина стерильна и безвредна для плотоядных животных и после двукратной иммунизации их в дозе 2,0 см³ индуцирует у них выработку антител против указанных болезней с титром: против бешенства – 7,0±1,0 log₂; против чумы плотоядных – 5,0±1,0 log₂, против парвовирусного энтерита 8,0±1,0 log₂, вирусного гепатита – 7,0±1,0 log₂. Коммерческая вакцина МУЛЬТИКАН-8 индуцировала примерно такие же титры антител.

Все иммунизированные животные после заражения контрольным вирусом бешенства выжили.

Сконструированная вакцина прошла комиссионные испытания на плотоядных животных и, по нашему заключению, ее можно рекомендовать для внедрения в практику

Summary. The article presents the results of the development and testing of the effectiveness of the liquid culture, inactivated, adjuvanted vaccine against rabies, canine distemper, canine parvovirus enteritis and adenovirus «TETRIVAK» containing equal volumes of rabies antigen, strain KMIEV-94 produced in cell culture BHK-21, distemper antigen, strain KMIEV-12B, produced in cell culture VERO, virus of CPV enteritis, strain KMIEV-14b produced in cell culture CRFK, adenovirus strain KMIEV-83 produced in cell culture MDCK. For inactivation of viruses teotropin 0,15% concentration and adjuvant 6% hidroxsal 10 vol /% were used. The vaccine is sterile and harmless for carnivores. After double immunization dogs and rabbits had an antibody titer 7,0±1,0; against rabies, 8,0±1,0 log₂, adenovirus 7,0±1,0 log₂, against CPV and against CDV 5,0±1,0 log₂. The commercial vaccine

MULTIKAN-8 induced approximately the same antibody titers... All immunized animals after infection with a virus control of rabies have survived.

The designed vaccine passed commission tests for carnivores and, in our opinion, it can be recommended for implementation in practice.

Введение. Бешенство, чума, вирусный гепатит и парвовирусный энтерит – наиболее распространенные вирусные болезни плотоядных животных, наносящие значительный экономический ущерб и представляющие социальную опасность.

Бешенство является исключительно опасным, абсолютно смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека и занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии. Заболевание бешенством имеет широкое распространение во многих странах мира, в т.ч. и в Беларуси. Причем напряженность эпизоотической ситуации по этой инфекции вследствие ее природно-очагового характера, несмотря на проводимые профилактические мероприятия практически не снижается.

Так, в 2012 г. на территории республики бешенство было выявлено у 580 животных. Обращаемость населения в связи с укусами, оцарапываниями и ослюнениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 23-28 тыс. случаев в год. В 2000-2011 гг. отмечены 8 случаев гибели от бешенства людей [4, 5, 7, 14].

Одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация.

В ветеринарной практике в настоящее время применяются как живые культуральные, так и инактивированные антирабические вакцины [14].

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

В России производятся и используются следующие инактивированные культуральные вакцины: вакцина из штамма Внуково-32 [1]; вакцина из штамма вируса бешенства Щелково-51 [10]; вакцина из штамма вируса бешенства ТС-80 [2]; вакцина из штамма РВ-97 (дери-ват штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ) [3].

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

Существенный удельный вес в инфекционной патологии плотоядных животных занимает чума [13]. К чуме плотоядных восприимчивы собаки, норки, песцы, соболи, хорьки, серебристо-черные лисицы и

другие звери всех возрастов. При чуме у животных поражается дыхательная, иммунная, кровеносная, нервная и пищеварительная системы. Летальность молодняка пушных зверей и собак при вспышке чумы плотоядных может достигать 80-100%, а взрослых животных 30-50%. Возбудитель устойчив к действию внешних факторов.

Для профилактики чумы плотоядных в Республике Беларусь применяются следующие вакцины: живая культуральная моновакцина российского производства, а также поливалентные вакцины: Гексаканивак, Биофак, Мультикан-4, Мультикан-8, Гексадог, Нобивак, Эурикан, Пентадог.

Парвовирусная инфекция собак, которая впервые была зарегистрирована в 1976 г. в Бельгии, в настоящее время широко распространена во многих странах мира. Заболеванию подвержены как молодые, так и взрослые животные. Парвовирусным энтеритом болеют собаки, могут болеть кошки, лисицы, еноты, песцы, норки и другие животные. Данное заболевание, как правило, имеет стационарный характер с охватом значительного количества животных. Наибольшую опасность она представляет для щенят в возрасте до 6 месяцев. У них летальность составляет 25%, но может достигать и 80% [12, 13, 15]. Хотя официальной статистики по указанному заболеванию в республике не ведется, косвенные источники (объемы вакцинаций) позволяют судить о его значительном распространении.

Надежным способом профилактики парвовирусного энтерита является вакцинация. Для этой цели используются инактивированные и живые аттенуированные вакцины [13, 15]. Из инактивированных вакцин в странах СНГ используют препарат «Биовак Д» из штамма Геркулес, препарат фирмы «Ветзвероцентр» из штамма Д (в моновалентном виде и как компонент ассоциированных вакцин).

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

Инфекционный гепатит или болезнь Рубарта – острая контагиозная болезнь плотоядных, протекающая с лихорадкой, воспалением конъюнктивы, слизистой оболочки носовой полости, желудочно-кешечного тракта, печени и желчного пузыря, а иногда и с поражением центральной нервной системы. Возбудителем заболевания является аденовирус 1 го типа (СAB-1) [13].

В естественных условиях к инфекционному гепатиту восприимчивы собаки всех возрастов и пород, а также лисицы, песцы, еноты и другие пушные звери.

С целью профилактики заболевания в ряде стран применяют инактивированные вакцины, которые индуцируют напряженный иммунитет продолжительностью до 1 года. Вакцины чаще всего ассоциируют с другими компонентами – вирусами чумы, бешенства и парвовирусного энтерита плотоядных [12, 15].

Вакцины против указанных заболеваний в республике не производятся, а закупаются по импорту, главным образом в России, Голландии, Франции. Поэтому разработка и налаживание производства таких отечественных вакцин будет иметь важное экономическое значение и позволит сократить затраты валюты на закупку за рубежом аналогичных препаратов. Особенно если учесть, что в Беларуси ежегодно прививается около 900 тыс. собак против бешенства, парвовирусного энтерита и чумы и свыше 900 тыс. норок против чумы.

Цель работы – сконструировать эффективную инактивированную вакцину против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита плотоядных, разработать рациональную технологию ее производства и внедрить в практику.

Для реализации указанной цели решались следующие задачи:

1. Изыскание рациональных способов получения вирусного сырья для изготовления вакцины.
2. Отработка методов и режимов инактивации вирусов.
3. Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине.
4. Конструирование вакцины и изучение ее безвредности, стерильности и иммуногенности.
5. Изучение срока годности вакцины.

Материалы и методы исследований.

Подопытные животные.

Исследования проводили на белых мышах, кроликах и собаках. Для опытов брали мышей массой 15-17 г, для титрации вируса и постановки реакции нейтрализации (РН) – массой 6-8 г. Кроликов массой 2-3 кг и собак массой 10-15 кг получали из питомников.

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.

Вирусы парвовирусного энтерита собак (ПВС) штамм КМИЭВ-14в, чумы плотоядных штамм КМИЭВ-12В и инфекционного гепатита

КМИЭВ-83 селекционированы из выделенных от собак эпизоотических штаммов и адаптированы: парвовирус к культурам клеток CrFK и MDCK, вирус чумы к культуре клеток Vero, вирус инфекционного гепатита – к культуре клеток MDCK .

Эталонный фиксированный вирус бешенства штамм CVS получен из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

Биопрепараты.

При изучении иммунологической эффективности сконструированного образца вакцины одновременно иммунизировали кроликов и собак 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 флюоресцирующие антирабические гамма-глобулины «Biorad» французского производства.

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

Для титрации в РГА парвовируса плотоядных и определения титра противопарвовирусных антител использовали эритроциты свиньи.

Культуры клеток.

Для культивирования фиксированного вируса бешенства использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/13, для культивирования вируса парвовирусного энтерита собак – культуру клеток CrFK, для культивирования вируса чумы плотоядных – культуру клеток Vero, для культивирования вируса инфекционного гепатита – культуру клеток MDCK.

Фармпрепараты.

Для инаktivации вакцинных вирусов использовали теотропин по ТУ 931004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, в качестве адьюванта – гидроксид по ГОСТ 18287.

Титрация вирусов и определение титров антител.

Титрование вируса бешенства и реакцию нейтрализации для определения титров вируснейтрализующих антител проводили на белых мышах, а также определение титров антирабических антител методом RFFIT проводили по общепринятым методам [8].

Титрацию вируса парвовирусного энтерита проводили в РГА со свиньиными эритроцитами и с помощью ИФА, титрацию антител к вирусу

в РТГА с этими же эритроцитами с 4-8 гемагглютинирующими единицами вируса. Титрацию вируса чумы плотоядных и антител к нему проводили на культуре клеток Vero, а инфекционного гепатита на культуре клеток МДСК по общепринятым методикам [8, 13].

Определение контаминации вирусных материалов и вакцины бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196-197, 2000-2001, ГФ Р.Б., Т.1. 2012. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

Определение безвредности и реактогенности вакцины.

Объединенную пробу из трех 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 и их обсуждение.

Получение вирусного сырья для изготовления экспериментального образца вакцины.

Культивирование вирусов для изготовления вакцины проводили роллерным в 2-литровых роллерах или статическим в 1,5-литровых матрасах способами при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Скорость вращения роллеров составляла от 8-12 об/мин. В качестве питательной среды использовали среды Игла или Игла МЕМ с добавлением 2-10% сыворотки крупного рогатого скота.

Вируса вносили в питательную среду одновременно с клетками, концентрация которых составляет 0,1-0,2 млн/мл. Для культивирования вируса бешенства использовали клетки ВНК-21/13, вируса чумы плотоядных – клетки VERO, вируса парвовирусного энтерита – клетки CrFK, вируса инфекционного гепатита-клетки МДСК. Заражающая доза вируса бешенства составляла 0,1-0,6 $\text{MLD}_{50}/\text{кл}$, вируса чумы плотоядных – $0,6 \pm 0,14 \text{ ТКИД}_{50}/\text{кл}$, вируса парвовирусного энтерита – 0,0005 ГАЕ/кл, вируса инфекционного гепатита-0,1-0,3 $\text{ТКИД}_{50}/\text{кл}$.

Все четыре полученных вирусных материала были стерильными в отношении бактериальной и грибковой флоры.

Наиболее высокое накопление вирусов происходило при роллерном способе выращивания. Так, титр вируса бешенства при роллерном способе культивирования составлял 7,0 lg и был на 0,2 lg выше, чем при статическом способе, титр вируса чумы плотоядных – 4,5 lg или на 0, 5 lg выше, титр вируса инфекционного гепатита-5,0 lg или на 0, 5 lg выше, титр парвовирусного энтерита - 10,0 \log_2 или на 2 \log_2 выше, чем при стационарном способе культивирования.

Инактивация вирусов.

Теотропин добавляли к вирусам 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 ПВС путем заражения культуры клеток CrFK в дозе 4-8 ГАЕ на пробирку, вирус чумы плотоядных путем заражения культуры клеток Vero в дозе 0,6 ТКИД₅₀/кл. вирус инфекционного гепатита путем заражения культуры клеток МДСК в дозе 0,3 ТКИД₅₀/кл. Исследования проводили в 3-х повторностях

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

В дальнейшей своей работе для инактивации вакцинных вирусов бешенства, чумы, ПВЭ и гепатита мы использовали интервал 24 часа и 0,15%-ю концентрацию теотропина, как более полно гарантирующую результат.

Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине

С целью определения оптимальной концентрации гидроксала в четырехвалентной вакцине в культуральные жидкости вируса бешенства, ПВЭ, инфекционного гепатита и чумы плотоядных добавляли 6% -й гидроксал в количестве 5 и 10%. Затем смесь вирусов с различным количеством гидроксала выдерживали помешивая в течение 18 часов в холодильнике при температуре 4°C и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость вируса бешенства титровали на белых мышах, вируса ПВЭ – в РГА, вируса чумы плотоядных на культуре клеток Vero, а вирусного гепатита – МДСК. С целью контроля титрации одновременно подвергали и исходные вирусы без добавления гидроксала.

Оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции всех четырех вирусов является 10 об%. Титр вируса бешенства при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 3,55 lg, титр вируса ПВЭ – на 6,0 log₂, титр вируса чумы плотоядных – на 1,0 lg, титр вируса гепатита – на 2,5 log₂.

В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

Для конструирования эффективного экспериментального образца вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных были приготовлены 3 варианта препа-

рата из инактивированных теотропином неконтаминированных вирусов с добавлением 10об% гидроксала по следующей схеме (табл. 1).

Таблица 1 – Схема компановки вариантов вакцины

№ п/п	Антиген вируса	Объем антигенов (см ³) на 100 см ³ вакцины		
		1 вариант	2 вариант	3 вариант
1.	Бешенство	25,0	30,0	25,0
2.	Чума плотоядных	30,0	25,0	25,0
3.	Парвовирус	25,0	20,0	25,0
4.	Инфекционный гепатит	20,0	25,0	25,0

С целью проверки безвредности и иммунологической эффективности сконструированных образцов вакцины в опыт были взяты 21 кролик массой 2,5-3,0 кг, разделенных на 7 групп по 3 кролика в каждой. Кроликам 1 группы введено внутримышечно по 2 см³ вакцины первого варианта, второй – такой же объем вакцины второго варианта и кроликам 3 группы – объем вакцины третьего варианта. Четвертая группа кроликов, вакцинированных 0,7 см³ антигена вируса бешенства, пятая, вакцинированных 0,7 см³ антигена вируса чумы, шестая, вакцинированных 0,7 см³ антигена парвовирусного энтерита плотоядных, и седьмая, вакцинированных 2 см³ вакцины Мультикан-8, служили контролем. Препараты вводили дважды с интервалом 21 день.

Через 14 дней после вакцинации сыворотки крови животных были исследованы на титры антител против вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и вирусного гепатита плотоядных.

Титры антител у кроликов, вакцинированных всеми тремя вариантами сконструированной вакцины, существенно не отличались. Титры антител против вируса бешенства в РН на белых мышах составляли 6,0±1,0 - 7,0±1,0 log₂, титры антигемагглютининов к парвовирусному энтериту 7,0±1,0 – 8,0±1,0 log₂, титры вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных 5,0±1,0 – 6,0±1,0 log, титры вируснейтрализующих антител к вирусу гепатита 7,0±1,0. Примерно такие же титры антител были и при вакцинации животных монокомпонентами вирусов в объемах, входящих в вакцину, а также вакциной Мультикан-8, что свидетельствует об отсутствии конкуренции вирусов в вакцине, а также о том, что по своей иммуногенной эффективности сконструированная вакцина не уступает коммерческой.

Исходя из этого, за окончательный принят вариант вакцины, включающий антигены вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и вирусного гепатита плотоядных в равных соотношениях.

Проверка иммунологической эффективности экспериментального образца трехвалентной культуральной вакцины против бешенства, парвовирусного энтерита, вирусного гепатита и чумы плотоядных проведена также в комиссионном опыте на собаках. С этой целью 10 собак

были разделены на 2 группы, по 5 голов в каждой. Животные первой группы были вакцинированы экспериментальным образцом четырехвалентной вакцины двукратно по 2,0 см³ с интервалом 21 день. Животные второй группы для контроля и по такой же схеме вакцинированы поливалентной вакциной российского производства Мультикан-8 (против чумы, аденовирусных инфекции, парвовирусного, кароновирозного энтеритов, лептоспироза и бешенства). Вакцины вводили внутримышечно в область бедра. Через 14 дней после вакцинации у животных были отобраны пробы крови для определения титров антител.

Об иммунологической эффективности вакцины судили по титрам специфических антител у вакцинированных животных.

Результаты определения иммунологической эффективности сконструированного экспериментального образца вакцины представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Титры специфических антител против вируса бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных у собак, вакцинированных четырехвалентной вакциной.

№ Группы	Вакцина	Доза см ³	Титры антител (log ₂) через 14 дней после вакцинации			
			антирабических	Противопарвовирусных	Противочумных	Противогепатитных
1	Четырехвалентная	2,0	6±1,0	8±1,0	5±1,0	6±1,0
2	Мультикан-8	2,0	6±1,0	7±1,0	5±1,0	6±1,0

Как видно из таблицы, у животных, привитых сконструированной четырехвалентной вакциной, титры антител к вирусу бешенства, парвовирусу, вирусу чумы и инфекционного гепатита плотоядных на 14 день после вакцинации были относительно высокими и практически не отличались от титров антител у животных, вакцинированных вакциной российского производства Мультикан-8. Все собаки в течение 40 дней после вакцинации оставались клинически здоровыми, местные реакции на месте введения вакцин отсутствовали.

Для установления срока годности сконструированной вакцины общая проба из 3-х ее серий были проверены на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую стерильность и безвредность через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре 4-8°C. Исследования проводились по ранее описанным методикам.

При этом установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 18 месяцев. Однако иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения снижалась. Поэтому в условиях хранения при 4-8°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления.

Заключение. 1. Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против бешенства, чумы парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных является безвредным, стерильным и высокоиммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства и может быть рекомендована в практику.

2. При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно внутримышечно с интервалом 21 день в объеме $2,0 \text{ см}^3$ через 14 дней после иммунизации они имели более высокие титры антител $6,0 \pm 1,0 - 7,0 \pm 1,0 \log_2$ против бешенства, $5,0 \pm 1,0 - 6,0 \log_2$ против вируса чумы, $7,0 \pm 1,0 - 8,0 \pm 1,0 \log_2$ против ПВЭ, вирусного гепатита - $7,0 \pm 1,0 \log_2$. Примерно такие же титры антител имели животные при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан-8. Все иммунизированные кролики при заражении вирусом бешенства не заболели.

3. Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает смешанные в равных объемах вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 в титре $6,8 - 7,0 \text{ Ig}$, выращенный в культуре клеток ВНК-21, вирус чумы плотоядных $4,5 \text{ Ig}$ ТЦД выращенный в культуре клеток Vero, штамм КМИЭВ-82, вирус ПВС КМИЭВ-14в в титре $7,0 - 8,0 \log_2$, выращенный в культуре клеток CrFK, вирусного гепатита КМИЭВ-83 $4,5 - 5,0 \pm 1,0 \text{ Ig}$, в качестве инактиватора вирусов – теотропин в $0,15\%$ -й концентрации, в качестве адьюванта – гидроксал в концентрации $10 \text{ об}\%$.

4. Способ изготовления вакцины включает репродукцию вирусов, их инактивацию и конструирование вакцины.

Вирус бешенства репродуцируют роллерным способом в среде Игла с клетками ВНК-21/13 в количестве $0,1 - 1,2 \text{ млн/мл}$, разлитую в роллерные флаконы по $200,0 \text{ см}^3$ вносят вирус в количестве $0,1 - 0,6 \text{ LD}_{50}/\text{Кл}$. Культивируют вирус при температуре 37°C и скорости вращения флаконов $18 - 28 \text{ об/мин}$.

Вирус чумы плотоядных репродуцируют в культуре клеток Vero со средой Игла и 10% сыворотками крупного рогатого скота в статических условиях в $1,5$ -литровых матрасах или в 2 -литровых роллерных флаконах при 37°C . Заражающая доза вируса составляла $0,01 \text{ ТЦД/кл}$.

Вирус ПВЭ репродуцируют в культуре клеток CrFK со средой Игла и 10% сыворотками крупного рогатого скота в статических условиях в $1,5$ -литровых матрасах или в 2 -литровых роллерных флаконах при 37°C . Заражающая доза вируса составляла $0,0005 \text{ ГАЕ/кл}$.

Вирус инфекционного гепатита репродуцируют в культуре клеток MDCK со средой Игла и 10% сыворотками крупного рогатого скота в статических условиях в $1,5$ -литровых матрасах или в 2 -литровых рол-

лерных флаконах при 37⁰С. Заражающая доза вируса составляла 0,01 ТЦД/кл.

Вирусное сырье через 3-4 суток культивирования после замораживания и оттаивания матрасов и флаконов инактивируют теотропином в 0,15%-й концентрации в течение 24 часов при 37⁰С, смешивают в равных объемах и добавляют гидроксал до конечной концентрации 100об%.

5. Хранение при температуре плюс 4-8⁰С обеспечивает годность вакцины в течение 18 месяцев со дня изготовления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barth, R. Vnukovo-32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans. Barth R. Franke V., Selimov M.A //Laboratory Techniques in Rabies. Word Health Organization, Geneva 1996. p.310-313.
2. Вишняков, И.Ф. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства. Никитин И.В., Недосеков В.В. //Ветеринария 1998 №1, с.22-24.
3. Гочмурадов, М.Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных. Автореф. дис. канд. вет. наук. Гочмурадов М.Г., Владимир. 1999. - С. 33.
4. Зибицкер, Д.Е. Бешенство и его профилактика. Зибицкер Д.Е., Ковалев Н.А. Мн., «Ураджай», 1970. – С. 200.
5. Ковалев, Н.А. Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси. Ковалев Н.А., Усеня М.М., Уласович П.А //Ветеринарная медицина Беларуси, №3, 2002 г. – С. 4-5.
6. Ковалев, Н.А. Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук, 2007, № 2, с. 80-87.
7. Ковалев Н.А. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы // Ветеринарная наука производству: научные труды, выпуск 40: материалы научно-практической конференции Ковалев Н.А., Бучукури Д.В. «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. – С. 353.
9. Назаров, В.П. Бешенство животных. Назаров В.П. – М., Сельхозгиз, 1961. –160с.
10. Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г. Кузнецов Н.Н., Иванов В.С. и др. Способ получения антирабической вакцины.
11. Селимов, М.А. Бешенство. Селимов М.А. – М., 1978, 336 с.
12. Сулимов, А.А. и др. Парвовирусный энтерит собак. Сулимов А.А. М., 1984.
13. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Т.В., Фомина Н.А. М., ВНИТИБП, 1988. – С. 928.
- 14.Таршис, М.Г. Бешенство животных. Таршис М.Г., Ковалев Н.А., Кузнецов П.П. - Мн.: «Ураджай», 1990. – С. 168.
15. Шуляк, Б.Ф. Вирусные болезни собак. Шуляк Б.Ф. М., 2004. – С. 560.