

УДК 619:615.371:636:619-097.3

*Н. А. КОВАЛЕВ, Дж. В. БУЧУКУРИ, М. М. УСЕНЯ*

**РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ  
ИЗ ШТАММА ВИРУСА 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ  
ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА**

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслеского НАН Беларуси*

*(Поступила в редакцию 23.01.2007)*

Бешенство является исключительно опасным, абсолютно смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека и занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии. Это заболевание широко распространено во многих странах мира, в том числе и в Беларуси. Причем напряженность эпизоотической ситуации по этой инфекции, несмотря на проводимые профилактические мероприятия, практически не снижается. Так, в 2005 г. бешенство выявлено у 626 животных, за 2006 г. – у 1614.

Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей, так как обращаемость населения в связи с укусами, оцарапываниями и ослонениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 28 тыс. случаев в год. В 2000–2006 гг. отмечено 6 случаев гибели людей от бешенства [4, 5].

Одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Л. Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков, главные из которых следующие: наличие в препарате большого количества мозговой «балластной» ткани и жизнеспособного вируса – источников поствакцинальных осложнений, а также необходимость многократных инокуляций вакцины, что побуждало исследователей на поиски новых путей совершенствования препарата. За прошедшие годы появилось много различных модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства, с одной стороны, путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцины при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности входящего в состав вакцин вируса.

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

В 90-х годах XX века для животных изготавливалось 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.

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

В России, как и в многих других странах, парентеральное применение живых антирабических вакцин в настоящее время запрещено.

Производятся и используются следующие инактивированные культуральные вакцины: вакцина из штамма Внуково-32; вакцина из штамма Щелково-51; вакцина из штамма ТС-80; вакцина из штамма РБ-97 [1, 2, 6];

Однако указанные вакцины не всегда являются эффективными, а способы их изготовления трудоемкие и требуют длительного времени, поэтому разработка новых вакцин и способов их

изготовления и усовершенствование существующих является актуальной проблемой. Особенно это актуально для Беларуси, где антирабическая вакцина для парентерального применения животным не производится и ее приходится закупать по импорту.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили в лаборатории и виварии ИЭВ им. С. Н. Вышелесского НАН Беларуси, а также виварии Белорусского государственного медицинского университета в 2000–2006 гг.

*Подопытные животные.* В опытах использовали белых мышей, кроликов и собак. Для опытов брали нелинейных белых мышей массой 15–17 и 8–10 г, кроликов породы Шиншилла массой 2–3 кг и собак различных пород массой 10–20 кг.

*Штаммы вируса.* Фиксированный вирус бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ был селекционирован в Белорусском НИИ экспериментальной ветеринарии Ковалевым Н. А. и др. из штамма «Овечий» ВГНКИ (А. с. № 1091393 от 08.01.1984 г.). В лаборатории института вирус поддерживается на культуре клеток РЭК. Фиксированный вирус бешенства штамм CVS получен из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. В БелНИИЭВ вирус адаптирован к культуре клеток РЭК.

*Биопрепараты.* При изучении иммунологической эффективности сконструированной вакцины животных с целью контроля прививали коммерческой культуральной антирабической вакциной из штамма ТС-80 Всероссийского института ветеринарной вирусологии и микробиологии (Россия, г. Покров) и культуральной антирабической вакциной из штамма Щелково-51 производства Щелковского биокомбината. Последняя также служила в качестве референс-вакцины при испытании иммуногенности сконструированной вакцины по методу НИИ [10]. Для диагностических исследований мозга подопытных животных, а также для титрации вируса и определения титров антител в культуре клеток применяли флуоресцирующий антирабический  $\gamma$ -глобулин производства Всероссийского НИИ (Россия, г. Казань).

*Культуры клеток.* Для культивирования фиксированного вируса бешенства использовали перевиваемые культуры клеток VERO, MA-104, FRHK, BGm, ПС, а также первичную культуру ФЭК. В качестве питательной среды применяли среду Игла с глютамином или среду 199. Культивирование клеток проводили по общепринятой методике при 37 °С в статических условиях в 1,5-литровых матрасах или в флаконах 500 мл на роллерной установке.

*Титрация вируса и определение титра вируснейтрализующих антител.* Проводили частично в культуре клеток, частично на белых мышах. На культуре клеток исследования проводили в полистироловых планшетах с 96 лунками фирмы FALKOM в инкубаторе с атмосферой CO<sub>2</sub> и увлажнением при температуре 37±0,5 °С. Титрование вируса бешенства и определение титров вируснейтрализующих антител на белых мышах проводили по общепринятым методам. Расчет титра – по методу Кербера. Титр выражался в lg [10].

*Определение иммуногенной активности вакцины.* Иммуногенную активность вакцины проверяли объемным методом Национальных Институтов Здравоохранения США (НИИ). По этому методу сравнивают 50%-ное конечное разведение (Kp) испытуемой вакцины с 50%Kp Международной эталонной вакцины (или эквивалентной национальной референс-вакцины) [10]. Иммуногенную активность выражали в международных единицах – МЕ (она должна была быть не менее 1,0). Иммуногенную активность вакцины иногда также определяли на белых мышах по методу В. П. Назарова [7]. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием методов И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева. Во всех опытах различия в результатах были достоверными при уровне значимости  $P < 0,05$  и  $P < 0,1$ .

**Результаты и их обсуждение.** Исследование проходило в несколько этапов.

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

С целью определения рационального способа получения вирусного сырья для изготовления вакцины репродукцию вакцинного вируса проводили в течение 4 последовательных пассажей на перевиваемых культурах клеток VERO, MA-104, FRHK, BGm, ПС, а также на первичной культуре ФЭК. Вирус в количестве 0,1–0,2 МИД<sub>50/кл</sub> вносили в питательную среду одновременно с клетками в концентрации 0,5–0,6 млн кл/мл или на сформировавшийся монослой. Культивирование проводили в стационарных условиях или на роллерной установке при 37 °С в течение

4–6 сут. Сбор вирусосодержащей жидкости проводили на 4-е и 6-е сутки. После каждого пассажа вирус титровали на белых мышах или на культуре клеток в полистироловых планшетах.

В результате установлено, что наиболее высокое накопление вакцинного вируса происходило на культурах клеток ПС ( $7,7 \pm 0,2 \lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$ ), ФЭК ( $6,8 \pm 0,1 \lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$ ) и VERO ( $6,6 \pm 0,2 \lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$ ). На остальных культурах клеток вирус накапливался в более низких титрах. Указанные титры вируса получены при роллерном способе культивирования клеток. При культивировании вируса в культурах клеток в статических условиях титры были на  $0,05\text{--}0,25 \lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$  ниже (табл. 1). Существенных различий в титрах вируса в вирусосодержащей жидкости первого (через 4 сут) и второго (через 6 сут) сливов не установлено.

Т а б л и ц а 1. **Накопление вакцинного вируса бешенства в различных культурах клеток при разных режимах культивирования**

Наименование культур клеток	Титр вируса ( $\lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$ ) при культивировании	
	в статических условиях	роллерным способом
VERO	$6,5 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$
MA-104	$6,3 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$
FRHK	$6,25 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,2$
BGm	$4,9 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
ПС	$7,5 \pm 0,25$	$7,7 \pm 0,2$
ФЭК	$6,75 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,1$

## 2. Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине.

Для определения оптимальной концентрации гидроксала в вакцине в вирусосодержащую культуральную жидкость добавляли указанный препарат в концентрации 5 и 10%. Затем смесь вируса с различной концентрацией гидроксала выдерживали, помешивая, в течение 18 ч в холодильнике при температуре  $4^\circ\text{C}$  и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость титровали по общепринятой методике на белых мышах. С целью контроля титрации одновременно подвергался и исходный вирус без добавления гидроксала. Оптимальной концентрацией считалась та, при которой он максимально сорбировал вирус (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. **Титры вируса бешенства в надосадочной жидкости после сорбции его гидроксалом в различной концентрации**

Количество гидроксала в смеси с вирусом, %	Время сорбции, ч	Температура сорбции, $^\circ\text{C}$	Титры вируса в надосадочной жидкости, $\lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$
5	18	4	$4,3 \pm 0,1$
10	18	4	$3,2 \pm 0,1$
Вирус без гидроксала (контроль)			$6,75 \pm 0,2$

П р и м е ч а н и е. Опыт проведен в 3-кратной повторности.

Как видно из таблицы, такой концентрацией гидроксала является 10 об%. Титр вируса при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на  $3,55 \lg \text{ЛД}_{50/\text{мл}}$ . В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

## 3. Отработка режимов и методов инактивации вируса.

В первоначальных опытах для инактивации вакцинного вируса использовали теотропин А-24. Препарат добавляли к вирусу до конечной концентрации 0,001, 0,01 и 0,05% и выдерживали в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$ , периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 33 ч отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность путем интрацеребральной инокуляции белым мышам и на иммуногенность методом НИН.

В результате было установлено, что теотропин в концентрации 0,01 и 0,05% через 33 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  полностью инактивировал вирус бешенства. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титр вируса. Иммуногенные свойства во все сроки исследования были практически одинаковыми (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Биологическая активность вируса бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ после инактивации теотропином А-24

Концентрация теотропина, %	Время инактивации, ч	Инфекционный титр, lg ЛД <sub>50/мл</sub>		Индекс иммуногенности, МЕ
		до инактивации	после инактивации	
0,001	12	6,5±0,2	6,1±0,2	1,1±0,02
0,01		6,3±0,3	5,0±0,1	1,08±0,02
0,05		6,2±0,2	4,0±0,1	1,05±0,01
0,001	24	6,8±0,1	5,1±0,2	1,15±0,01
0,01		6,6±0,2	4,2±0,1	1,13±0,02
0,05		6,5±0,2	3,3±0,2	1,01±0,01
0,001	33	6,1±0,1	1,8±0,1	1,02±0,01
0,01		6,2±0,1	0	1,01±0,01
0,05		6,5±0,2	0	1,0±0,02

В дальнейшей своей работе для инактивации вакцинного вируса бешенства мы использовали 0,01%-ную концентрацию теотропина, как более щадящую.

Во второй серии опытов для инактивации вакцинного вируса бешенства был использован димер этиленimina в 0,01, 0,02 и 0,03%-ной концентрации.

Проведенные исследования показали, что димер этиленimina в 0,03%-ной концентрации обеспечивал полную инактивацию вируса при 37 °С уже в течение 12 ч. Иммуногенные свойства вируса при использовании обоих этих препаратов существенно не различались (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Биологическая активность вируса бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ после инактивации димером этиленimina (ДЭИ)

Концентрация (ДЭИ), %	Время инактивации, ч	Инфекционный титр lg ЛД <sub>50/мл</sub>		Индекс иммуногенности, МЕ
		до инактивации	после инактивации	
0,01	12	6,7±0,2	5,7±0,2	1,15±0,02
0,02		6,0±0,2	5,0±0,1	1,10±0,02
0,03		6,5±0,2	0	1,13±0,01
0,01	24	7,0±0,3	6,2±0,2	1,24±0,02
0,02		6,6±0,2	5,7±0,1	1,13±0,01
0,03		6,5±0,2	0	1,02±0,01

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

Для конструирования вакцины использована культуральная вирусосодержащая жидкость фиксированного вируса бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ с титром не ниже 5,0 lg ЛД<sub>50/мл</sub> с добавлением 10 об% гидроксала (0,6% конечной концентрации сухого остатка). Для культивирования вируса использованы перевиваемые линии клеток ПС, VERO и первично-трипсинизированная культура клеток куриных фибробластов (ФЭК). Инактивацию вируса бешенства проводили теотропином (А-24) в 0,01%-ной концентрации при температурном режиме 37 °С и экспозиции 33 ч или димер этиленimina в концентрации 0,03% при температуре 37 °С и экспозиции 12 ч. Полноту инактивации определяли путем интрацеребрального заражения белых мышей. Гидроксал добавляли после инактивации вируса.

Стерильность определяли путем посева вакцины на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабура; безвредность – путем подкожного введения по 0,5 мл вакцины 10 белым мышам массой 15–16 г. Срок наблюдения 10 дней. Результаты учитывались по отсутствию роста микроорганизмов и выживаемости животных. До инактивации вакцинный вирус титровался на белых мышах.

Иммуногенную активность приготовленной инактивированной вакцины исследовали по методу Назарова [7].

В результате изготовленные опытные серии антирабической жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины для профилактики бешенства у сельскохозяйственных животных при посевах на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабура и выдерживании в термостате при 37 °С и 24 °С в течение 10 дней были стерильными в отношении бактерий и грибов.

При подкожном введении вакцины по 0,5 см<sup>3</sup> 10 белым мышам массой 15–16 г они оставались здоровыми в течение 10 дней наблюдения, что свидетельствует о безвредности препарата.

При испытании иммуногенной активности вакцины по В. П. Назарову получены данные, свидетельствующие о ее иммуногенности. Из 5 мышей, вакцинированных вакциной в разведении 1:5, выжили все животные; в разведении 1:10 – 4 мыши; 1:40 – 1 мышь. Все неиммунизированные животные пали от бешенства.

Отдельный опыт по изучению иммуногенных и антигенных свойств вакцины был поставлен на кроликах. С этой целью были сформированы 3 группы кроликов, по 4 в каждой: I группа была иммунизирована сконструированной антирабической вакциной подкожно в дозе по 2 мл двукратно с интервалом 21 день; II группа животных иммунизирована коммерческой антирабической вакциной (производство ВНИИВВиМ, Россия, г. Покров) в той же дозе; III группа – неиммунизированные животные (контроль).

Через 35 дней после иммунизации от всех кроликов были взяты пробы крови, после чего животных заразили вирусом бешенства штамм CVS путем подкожного введения мозговой суспензии вируса в разведении 1:10 в область передней лапки в объеме 1,0 мл. Результаты опыта учитывались по выживаемости животных в течение 21-дневного срока наблюдения и титра вируснейтрализующих антител. Сыворотки крови исследованы на наличие антирабических антител в РН на белых мышах (табл. 5).

**Таблица 5. Титры специфических антител и результат заражения вирусом бешенства кроликов, вакцинированных жидкой инактивированной культуральной сорбированной антирабической вакциной и коммерческой вакциной**

Группа	Наименование вакцины и доза, см <sup>3</sup>	Номер животного	Титры антител в РН через 14 дней после иммунизации	Результат заражения		Продолжительность инкубационного периода, дни
				выжили	заболели	
I	Сконструированная, 2,0	1	1:80	+	–	
		2	1:160	+	–	
		3	1:160	+	–	
		4	1:80	+	–	
			$M \pm m$ 120,0 $\pm$ 8,42			
II	Коммерческая, 2,0	5	1:80	+	–	
		6	1:40	+	–	
		7	1:160	+	–	
		8	1:40 $\pm$ $M \pm m$ 80,0 $\pm$ 9,34	+	–	
III	Невакцинированные животные (контроль)	9	0	–	+	7
		10	0	–	+	6
		11	0	–	+	6
		12	0	–	+	7
			0			

Как видно из таблицы, кролики I группы через 14 дней после иммунизации имели титры от 1:80 до 1:160 ( $M \pm m$  120,0 $\pm$ 8,42). Кролики II группы имели более низкие титры – от 1:40 до 1:160 ( $M \pm m$  80,0 $\pm$ 9,34). У неиммунизированных кроликов антирабические антитела отсутствовали.

При заражении вирусом бешенства все иммунизированные кролики обеими вакцинами не заболели. Невакцинированные (контроль) заболели на 6–7-й день после заражения и пали через 1–2 дня после заболевания.

Таким образом, результаты проведенных исследований экспериментальных серий жидкой инактивированной культуральной сорбированной антирабической вакцины показали, что она стерильна, безвредна, иммуногенна и обладает высокой иммунологической эффективностью на лабораторных животных.

#### **5. Изучение жидкой инактивированной культуральной сорбированной антирабической вакцины в комиссионном и производственном опытах.**

При комиссионной проверке безвредности, стерильности и иммуногенности вакцины антирабической жидкой культуральной инактивированной сорбированной из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ установлено следующее.

Изготовленная опытная серия антирабической вакцины в объеме 5,0 л для профилактики бешенства у сельскохозяйственных животных при посевах на МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуро и выдерживании в термостате при 37 °С и 24 °С в течение 10 дней была стерильной в отношении бактерий и грибов.

При подкожном введении вакцины 1:5 по 0,5 см<sup>3</sup> 10 белым мышам массой 15–16 г они оставались здоровыми в течение 10 дней наблюдения, что свидетельствует о безвредности препарата.

При испытании иммуногенной активности вакцины по В. П. Назарову получены данные, свидетельствующие о ее высокой иммуногенности. Из 5 мышей, вакцинированных вакциной в разведении 1:5, при заражении вирусом бешенства штамм CVS выжили все животные; в разведении 1:10 – 4 мыши; 1:40 – 1 мышь. Все неиммунизированные животные пали от бешенства.

Параллельные исследования по вышеуказанным показателям коммерческой вакцины производства Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (Россия, г. Покров) показало сходные результаты.

В производственном опыте эффективность инактивированной культуральной сорбированной антирабической вакцины была изучена на собаках в виварии Белорусского государственного медицинского университета.

С этой целью в опыте были сформированы 3 группы собак, по 10 животных в опытных и 4 в контрольной группе: I группа животных была иммунизирована инактивированной культуральной сорбированной антирабической вакциной внутримышечно в дозе 2,0 см<sup>3</sup> двукратно с интервалом 21 день; II группа животных была иммунизирована коммерческой антирабической вакциной в дозе 2,0 см<sup>3</sup> двукратно с интервалом 21 день (вакцина производства ВНИИВВиМ, Россия, г. Покров); III группа (контроль) – неиммунизированные животные.

За животными было установлено клиническое наблюдение. Перед вакцинацией и через 35 дней от начала иммунизации от всех животных были получены пробы крови, которые были исследованы на наличие антирабических антител в реакции нейтрализации на белых мышах.

В результате все вакцинированные обеими вакцинами животные оставались клинически здоровыми, имели нормальную температуру тела, сохраняли хороший аппетит, видимая реакция на месте введения препаратов отсутствовала, что свидетельствует о безвредности сконструированной вакцины.

До вакцинации вируснейтрализующие антитела в сыворотках крови у всех животных отсутствовали.

Как видно из табл. 6, собаки, иммунизированные жидкой культуральной инактивированной сорбированной антирабической вакциной, через 14 дней после иммунизации имели титры от 1:80 до 1:160 ( $M \pm m$  104,0 $\pm$ 12,21). Собаки II группы имели более низкие титры – от 1:40 до 1:80 ( $M \pm m$  60,0 $\pm$ 9,43). У неиммунизированных животных антирабические антитела отсутствовали.

Таким образом, полученные результаты подтвердили, что сконструированная нами инактивированная культуральная сорбированная антирабическая вакцина является стерильным, безвредным и иммуногенным препаратом, не уступающим по своей эффективности коммерческим вакцинам зарубежного производства, и может быть рекомендована для применения в практике.

Экономическая эффективность применения вакцины составляет 6 руб. на 1 рубль затрат. (Цены 2006 г.)

#### **6. Изучение срока годности жидкой антирабической вакцины.**

Для установления срока годности сконструированной вакцины три ее серии были проверены на иммуногенную активность, стерильность и безвредность через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения при температуре 4 °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 4 °С оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (табл. 7).

**Т а б л и ц а 6. Титры вируснейтрализующих антирабических антител в сыворотках крови собак, вакцинированных жидкой культуральной сорбированной инактивированной антирабической вакциной и коммерческой вакциной**

Группа	Наименование вакцины и доза, см <sup>3</sup>	Номер животного	Титры антител в РН через 14 дней после иммунизации
I	Сконструированная, 2,0	26	1:80
		27	1:80
		34	1:160
		35	1:80
		55	1:80
		58	1:160
		59	1:80
		61	1:80
		67	1:160
		68	1:80
			<i>M±m</i> 104,0±12,21
II	Коммерческая, 2,0	32	1:80
		50	1:40
		51	1:40
		54	1:40
		56	1:80
		62	1:40
		63	1:80
		64	1:80
		65	1:40
		66	1:80
			<i>M±m</i> 60,0±9,43
III	Невакцинированные животные (контроль)	31	0
		33	0
		36	0
		37	0

**Т а б л и ц а 7. Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной антирабической вакцины через различные сроки хранения (n-3)**

Показатель	Срок хранения, мес.			
	6	12	18	24
Иммуногенная активность (МЕ)	1,10±0,02	1,02±0,01	1,0±0,02	0,7±0,01
Стерильность	+	+	+	+
Безвредность	+	+	+	+

П р и м е ч а н и е. Знак (+) – положительный результат.

### Выводы

1. Сконструированная вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная антирабическая для профилактики бешенства животных является безвредным, стерильным и высокоиммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства.

2. При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно с интервалом 21 день в дозе 2,0 см<sup>3</sup> через 35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры вируснейтрализующих антител (120,0±8,42 и 104,3±12,21), чем при иммунизации коммерческой вакциной ВНИИВВиМ (80,0±9,34 и 60,0±9,43). Все иммунизированные кролики при заражении вирусом бешенства не заболели.

3. Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает вакцинный вирус бешенства штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ в титре 6,5–7,0 lg ЛД<sub>50/мл</sub>, выращенный в культуре клеток ПС, ФЭК или VERO, в качестве инактиватора вируса – теотропин А-24 или димер этиленимин при следующих соотношениях компонентов, %: вирусосодержащий материал

штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ – 89,07–89,09, гидроксал – 10,0, инактиватор вируса теотропин А-24 или димер этиленимин – 0,01–0,03.

4. Способ изготовления вакцины антирабической жидкой культуральной сорбированной инактивированной включает культивирование вируса, его инактивацию и конструирование вакцины.

Вирус в количестве 0,1–0,2 МИД<sub>50/кл</sub> вносят одновременно с клетками ПС, ФЭЖ или VERO в концентрации 0,5–0,6 млн кл/мл или на сформированный монослой и выращивают в стационарных или роллерных условиях в среде Игла при 37 °С в течение 4–6 сут, вирусное сырье инактивируют тиотропином А-24 в 0,01%-ной концентрации в течение 33 ч или димер этиленимином в 0,03%-ной концентрации в течение 12 ч при 37 °С, добавляют гидроксал до конечной концентрации 10 об%

5. Хранение при температуре 4 °С обеспечивает годность вакцины в течение 18 мес. со дня изготовления.

На основании проведенных исследований разработана и утверждена НТД (ТУ, Инструкция по изготовлению и контролю, Наставление по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную антирабическую из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ.

Вакцина зарегистрирована для производства и применения в Республике Беларусь.

### Литература

1. Barth R., Franke V., Selimov M. A. Vnukovo-32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans. // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization, Geneva 1996. P. 310–313.
2. Вишняков И. Ф., Никитин И. В., Недосеков В. В. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства // Ветеринария. 1998. № 1. С. 22–24.
3. Гочмурадов М. Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир, 1999.
4. Зибцкер Д. Е., Ковалев Н. А. Бешенство и его профилактика. Минск: Ураджай, 1970.
5. Ковалев Н. А., Усеня М. М., Уласович П. А. Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси // Ветеринарная медицина Беларуси 2002. № 3. С. 4–5.
6. Способ получения антирабической вакцины. Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г.: / Н. Н. Кузнецов, В. С. Иванов и др.
7. Назаров В. П. Бешенство животных. М.: Сельхозгиз, 1961.
8. Селимов М. А. Бешенство. М., 1978.
9. Таршис М. Г., Ковалев Н. А., Кузнецов П. П. Бешенство животных. Минск: Ураджай, 1990.
10. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева, ВОЗ, 1975.

*N. A. KOVALIOV, J. V. BUCHUKURI, M. M. USENIA*

### DEVELOPMENT AND STUDY OF THE VACCINE EFFICACY FOR IMMUNIZATION OF ANIMALS AGAINST RABIES (STRAIN 71 BelNIIEV- VGNKI)

### Summary

Rabies is a dangerous disease for warm blood animals, including humane and creates the economical and social emergency for many countries. Belarus also has the same problems. General measures for rabies prophylaxis is a rabies vaccination of animals.

Belarus does not produce rabies vaccine. Therefore, the Belarusian Institute of Experimental Veterinary-Medicine worked out a liquid inactivated rabies vaccine based on strain 71 BelNIIEV-VGNKI and a method of production.

This rabies vaccine is a safety, steril and high immunogenic drug. This vaccine has been registered at the Central Board of Veterinary Medicine Ministry of Agriculture and Food for factory production and use in Belarus.