

УДК 619:578.824.11

**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор  
**Бучукури Д.В.**, кандидат ветеринарных наук, доцент  
**Курбат И.А.**, старший научный сотрудник  
**Крюкова К.А.**, магистр ветеринарных наук, аспирант

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь*

## ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

### Резюме

*Использование культуральных вакцин в современной вирусологии считается высокоэффективным и удобным методом профилактики инфекционных заболеваний. При производстве этих биопрепаратов особое внимание уделяется очистке от сывороточных белков самой клеточной линии, на которой выращивается вирус, чтобы минимизировать аллергические реакции. Концентрирование вируса как важнейший этап при производстве высокоэффективной вакцины также является актуальным.*

**Ключевые слова:** бешенство, вакцины, очистка, концентрирование, вирусодержащая жидкость.

### Summary

*The use of culture-based vaccines in modern virology is considered a highly effective and widespread method for preventing infectious diseases. During the production of these biopreparations, special attention is paid to the purification of the serum proteins of the cell line used to grow the virus, thereby minimizing disease progression. Virus concentration, a crucial step in the production of highly effective vaccines, is also crucial.*

**Keywords:** rabies, vaccines, purification, concentration, virus-containing liquid.

*Поступила в редакцию 08.05.2026 г.*

### ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – острое вирусное заболевание с абсолютно смертельным исходом, поражающее центральную нервную систему человека и теплокровных животных. Распространено во многих странах мира, в том числе и в Беларуси. По своей социально-экономической значимости болезнь занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии людей и животных, поэтому его изучению, разработке мер профилактики и борьбы с ним уделяется исключительное внимание.

Одной из основных мер профилактики бешенства была и остается антирабическая вакцинация. Использование культуральных вакцин в современной вирусологии считается высокоэффективным и удобным методом профилактики инфекционных заболеваний [1]. При производстве культуральных инактивированных вакцин особое внимание уделяется очистке от сывороточных белков и самой клеточной линии, на которой культивируется вирус, для снижения реактогенности вакцины и повышения ее специфической активности [2, 3]. Этап осветления вирусодержащей жидко-

сти (ВСЖ) центрифугированием используется для разделения компонентов по плотности, что помогает очищать вирусы от клеточного детрита для защиты фильтрующих систем [4]. Очистка вирусодержащей жидкости позволяет освободить основной компонент вакцины от посторонних белков, которые не влияют на иммунологическую активность вакцины [5]. Концентрирование ВСЖ определяется как процесс повышения концентрации вирусных частиц в растворе с использованием таких методов, как ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, концентрирование полиэтиленгликолем или иммунологический захват с помощью антител, сорбированных на нерастворимом носителе, и хроматография. Основная цель – очистить и сконцентрировать вирус, удалив при этом нежелательные компоненты из образца [2].

В технологическом процессе производства вакцин стремятся достичь максимальной концентрации вирусных частиц (антигена) для обеспечения высокой иммуногенности препарата. Классические физические методы концентрирования вируса из разбавленного раствора включают ультра-

трацентрифугирование и ультрафильтрацию с использованием диализной мембраны в качестве ультрафильтра.

Мембранная фильтрация – это процесс разделения под давлением, в котором используются мембраны для разделения компонентов в жидком растворе или суспензии в зависимости от их размера и различий в заряде.

Ультрафильтрация представляет собой разновидность мембранной фильтрации, при которой гидростатическое давление прижимает жидкость к полупроницаемой мембране. Растворитель и низкомолекулярные растворенные вещества проходят через мембрану и называются пермеатом, тогда как взвешенные твердые частицы и высокомолекулярные растворенные вещества задерживаются на ней [6].

Кроме вышеуказанных методических подходов, в последние годы начали использовать тангенциальную потоковую фильтрацию (фильтрацию в перекрестном потоке). Ее сущность состоит в том, что поток нефильтрованного продукта движется тангенциально к поверхности мембраны. Турбулентность, создаваемая на поверхности мембраны, уменьшает загрязнение и улучшает характеристики потока, а также проходимость жидкости и обеспечивает более длительный срок функционирования фильтра, чем при тупиковой фильтрации [6, 7, 8].

Таким образом, процесс концентрации вируса необходим при современном производстве вакцин: он позволяет увеличить их иммуногенную активность, следовательно, повышает эффективность.

**Целью** исследования является сравнительное изучение различных фильтров для очистки и концентрирования вируса бешенства из культуральной вирусосодержащей жидкости.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использован фиксированный культуральный вирус бешенства (штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ), который был селекционирован в Институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского и позднее адаптирован к культуре клеток ВНК-21.

Для проведения исследований вирус бешенства (штамм 71 БелНИИЭВ-

ВГНКИ) был накоплен на перевиваемой культуре клеток ВНК-21, выращенной на питательной среде Игла с двойным набором аминокислот. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 72 ч на роллерной установке со скоростью вращения роллеров 8–14 об/ч. Замораживание/оттаивание ВСЖ производили двукратно.

Для очистки и фильтрации в работе использовали ацетатно-целлюлозные мембраны (АЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм, которые монтировали в фильтрационную установку. Для смачивания поверхности фильтра пропускали стерильную дистиллированную воду под отрицательным давлением. В дальнейшем вместо воды через фильтр пропускали поддерживающую питательную среду после культивирования клеток (без инфицирования их вирусом). При этом оценивали скорость прохождения жидкости через фильтр и наличие осадка клеток на его поверхности под микроскопом.

С целью увеличения пропускной способности фильтра питательную среду с клетками осветляли с помощью сконструированного фильтрующего устройства и нетканого материала с диаметром пор 100,0 мкм.

Последовательность операции осветления поэтапно:

- заранее известный объем питательной среды с клетками пропускали через нетканый материал;

- проводили фильтрацию через мембрану АЦМ с диаметром пор 0,45 мкм;

- на последнем этапе использовали мембрану АЦМ с диаметром пор 0,22 мкм.

Наряду с АЦМ, для осветления испытывали фильтрационную пластину FILTRAK (плотная, узкопористая, медленно фильтрующая, для тонких осадков). Испытания проводили аналогичным образом как для воды, так и для поддерживающей питательной среды с суспензией клеток или клеточного детрита.

Для осуществления концентрации вируса бешенства после осветления от клеточного детрита использовали метод ультрафильтрации с использованием диализной мембраны в качестве ультрафильтра мембраны (мешки) для диализа. В диализный мешок вносили ВСЖ в объеме

1,0 л и с помощью ПЭГ-6000 в течение 2 ч получали 500,0 мл концентрата. Концентрацию осуществляли двукратно, далее определяли титр вируса.

Титрование вируса проводили на белых мышах массой 6,0–8,0 г. Животных разделили поровну на 8 групп (7 опытных и 1 контрольная) по 4 головы в каждой. Готовили ряд последовательных десятикратных разведений вирусосодержащего материала (от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ).

Мышей опытных групп заражали интрацеребрально в дозе 0,03 мл в разведениях от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . При введении животных надежно фиксировали. Введение вирусосодержащего материала осуществляли на расстоянии 1,0–2,0 мм от точки пересечения средней линии черепа с линией, соединяющей углы глаз. Контрольной группе животных вирусосодержащий материал не вводили.

Наблюдение за подопытными животными осуществляли на протяжении 15 дней. Учет специфического падежа проводили с 5-го дня опыта.

Титр вируса рассчитывали по методу Кербера [9].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При оценке пропускной способности АЦМ с диаметром пор 0,45 мкм в отношении воды установлено, что скорость прохождения воды сквозь фильтр составляет 1,0 л за 1,5 мин.

Таблица – Изменение титров вируса после очистки и концентрирования ВСЖ

| Концентрация вируса              | Этапы очистки вируса |                            |                                              |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------------------|
|                                  | до очистки           | после очистки (фильтрация) | после очистки и концентрации (с помощью ПЭГ) |
| Титр, lg MICLD <sub>50</sub> /мл | 6,5                  | 6,5                        | 6,8                                          |

Таким образом, титр вируса до очистки составлял 6,5 lg MICLD<sub>50</sub>/мл, после осветления и фильтрации остался на этом же уровне – 6,5 lg MICLD<sub>50</sub>/мл, а после концентрирования ПЭГ повысился до 6,8 lg MICLD<sub>50</sub>/мл.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных нами результатов можно утверждать, что указанные методы очистки ВСЖ от белков клеточной линии позволяют сохранить кон-

В дальнейшем для осветления ВСЖ использовали АЦМ с диаметром пор 0,45 мкм, а для стерилизующей фильтрации после грубой очистки ВСЖ – фильтрующие пластины с диаметром пор 0,22 мкм.

Пропускная способность фильтра с диаметром пор 0,45 мкм без предварительного осветления составила 100,0 мл среды с клетками за 8 мин. При этом на поверхности фильтра под микроскопом обнаруживали мертвые клетки.

В процессе осветления и фильтрации выяснилось, что пластины FILTRAK оказались непригодными как для осветления, так и для стерилизации ВСЖ, т.к. они продемонстрировали низкую фильтрационную способность (100,0 мл в течение 13–15 мин). Также установлено, что пропускная способность указанного каскада для фильтрации составляла около 10,0 л/ч. При этом титр очищенного вируса от клеточного детрита после проверки составил 6,5 lg MICLD<sub>50</sub>/мл.

При двукратной концентрации вирусосодержащей жидкости через диализную мембрану с применением ПЭГ-6000 титр вируса бешенства повысился на 0,3 lg MICLD<sub>50</sub>/мл и составил 6,8 lg MICLD<sub>50</sub>/мл.

Сравнительные результаты проверки титра вируса после очистки и концентрации приведены в таблице.

центрацию вируса после его фильтрации. При этом титр очищенного вируса от клеточного детрита после проверки составил 6,5 lg MICLD<sub>50</sub>/мл.

Двукратное концентрирование вируса с помощью ПЭГ дает возможность увеличить титр вируса до 6,8 lg MICLD<sub>50</sub>/мл.

Эти методы очистки и концентрирования вируса являются технологичными и могут быть применены при производстве современных вакцин с высокой иммунной активностью.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Клеточные культуры в вирусологии: от прошлого к будущему / Т. А. Кузнецова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2024. – №. 1. – С. 143–153.
2. Медунцын, Н. В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней / Н. В. Медунцын, В. И. Покровский. – М. : Гэотар-Медиа, 2005. – 506 с.
3. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова ; под ред. Р. В. Белоусовой. – М. : Колос, 2007. – 422 с.
4. Папуша, Н. В. Основы биотехнологии : учеб. пособие / Н. В. Папуша. – Костанай : КГУ им. А. Байтурсынова, 2019. – 185 с.
5. Разработка и производство биологических препаратов для профилактики инфекционных болезней животных в Беларуси : в 2 ч. – Ч. 1. Общие вопросы разработки и производства биопрепаратов / П. А. Красочко, П. П. Красочко, В. А. Машеро [и др.]; под общ. ред. П. А. Красочко. – Минск : ИВЦ Минфина, 2024. – 432 с.
6. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов / А. В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 1. – С. 79–84.
7. Virus concentration or virus yield is usually expressed as weight per unit of fresh weight of tissue or weight per millilitre of extract. Virus Concentration In subject area: Immunology and Microbiology From: Matthews' Plant Virology (Fourth Edition), 2002. – 1001 p.
8. Laboratory techniques in rabies / edited by F.-X. Meslin, M. M. Kaplan, H. Koprowski. – 4th ed. – Geneva : World Health Organization, 1996. – 476 p.
9. Ветеринарная вирусология. Практикум : учеб. пособие / Р. Б. Корочкин [и др.] ; под ред. Р. Б. Корочкина. – Минск : ИВЦ Минфина, 2020. – 346 с.

## ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

# ЭПРИНОВЕТ

- ▶ имеет широкий спектр действия на эндо- и эктопаразитов
- ▶ эффективен при имагинальных и личиночных стадиях развития нематод желудочно-кишечного тракта и легких, личинок оводов, чесоточных клещей, вшей и др. эктопаразитов



- ▶ применяют крупному рогатому скоту, овцам для лечения и профилактики желудочно-кишечных и легочных нематодозов перорально с концентрированными кормами групповым способом или индивидуально

[WWW.BIEVM.BY](http://WWW.BIEVM.BY)