

ДИНАМИКА АДАПТАЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ВАКЦИННОГО ШТАММА «RV-97» К МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21/13

Шишков Александр Валерьевич, ведущий ветеринарный врач

Пяткина Алла Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

ФГБУ «ВНИИЗЖ» Федеральный центр охраны здоровья животных

600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, тел. 8(4922) 26-06-14, тел/факс 26-15-73, e-mail: shishkov@

arriah.ru,

Ключевые слова: адаптация, бешенство, штамм RV-97, культура клеток, ВНК-21, инфекционная активность, ККИД₅₀/см³.

Проблема бешенства как одного из наиболее опасных зоонозов продолжает сохранять свою актуальность практически во всем мире. При изготовлении живой вакцины важным этапом является получение активного компонента – вируса, сохраняющего заданные фенотипические свойства, главную роль играет система культивирования возбудителя. Цель настоящей работы состояла в адаптации вируса бешенства штамма «RV-97» к перевиваемой клеточной линии почки сирийского хомячка (ВНК-21/13) шведской сублинии, а также – в проведении сравнительного анализа накопления вируса на различных пассажах. Определяли число пассажей, которые необходимо провести для адаптации штамма «RV-97» к монослойной культуре клеток ВНК-21/13. В работе использовали 2-х суточную культуру клеток ВНК-21/13, находящуюся в фазе логарифмического роста (80-90 % формирование монослоя клеток). В качестве тест-системы инфекционной активности использовали культуру клеток ВНК-21/13, выращенную в виде монослоя в лунках плоскодонных пластиковых планшетов. Для индикации инфицированных клеток использовали флуоресцентную метку. Определили, что наименьшее число пассажей, при котором вирус бешенства штамма «RV-97» является адаптированным к перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13 шведской сублинии на уровне 6 пассажа. Установлено, что титр инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма «RV-97» на уровне 6 пассажа составляет $7,33 \pm 0,17 \text{ lg ККИД}_{50}/\text{см}^3$.

Введение

В настоящее время проблема бешенства как одного из наиболее опасных зоонозов продолжает сохранять свою актуальность практически во всем мире [1]. Заболевание вызывается нейротропными вирусами рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae* порядка *Mononegavirales* и передается всем млекопитающим. При этом единственным надежным способом борьбы с бешенством является специфическая профилактика болезни, а именно, вакцинация дикой фауны, являющейся основным резервуаром инфекции [2, 3].

В мире существуют большое количество коммерческих антирабических препаратов для оральной иммунизации диких животных, значительную часть из которых занимают живые вакцины и каждый препарат имеет свои особенности [4, 5].

При изготовлении живой вакцины важным этапом является получение активного компонента – вакцинного вируса, который способен

накапливаться в необходимой концентрации и сохранять исходные фенотипические свойства. Здесь существенную роль играет система культивирования возбудителя.

Для репродукции вируса бешенства первоначально во всем мире применяли первичные культуры клеток различных животных: почки собаки, поросенка, сирийского хомяка [4, 6]. Однако, получение первично-трипсинизированных культур достаточно трудоемкий и малопродуктивный процесс, который при масштабном изготовлении вакцины существенно влияет на рентабельность производства. В этой связи использование перевиваемых клеточных культур имеет большую эффективность [7, 8].

Вирус бешенства успешно адаптировали к таким перевиваемым клеточным линиям как почка сирийского хомячка (ВНК-21), почка зеленой африканской мартышки (VERO), почка сайги (ПС), фибробласты хомяка (NiL-2), фибробласты эмбриона птиц (CEF), мышьяная нейробластома (MNL) [9, 10, 11, 12, 13]. В частности показана

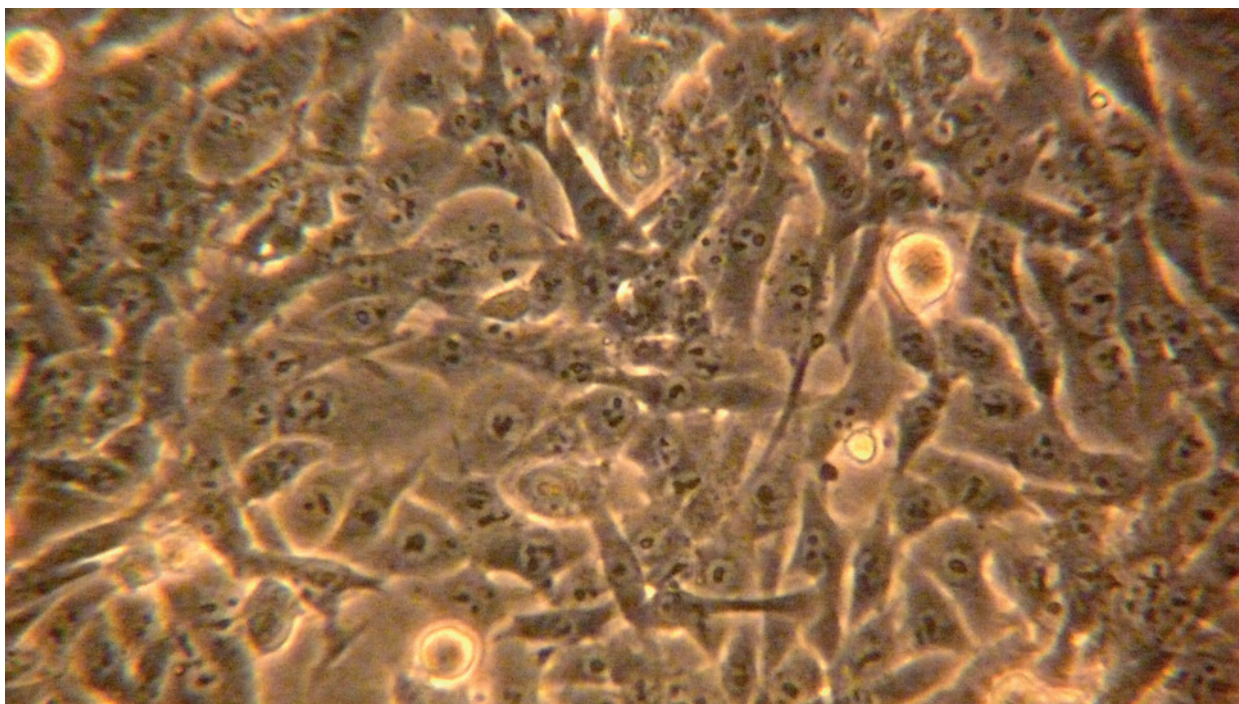


Рис.1 - Морфология клеточной линии ВНК-21 (Шведская линия). Монослой 48 часов - интактная. Электронный микроскоп. Объектив $\times 400$.

возможность адаптации штаммов РВ-71 и ТС-80 к культуре клеточных линий VERO, ВНК-21/2, MARC-145, W-91, ПС и получение на уровне 3-10 пассажа высокоактивного вирусного материала в титре от 5,6 до 7,0 lg ККИД₅₀/см³ [6, 14, 15].

Группе ученых ФГБУ «ВНИИЗЖ» удалось адаптировать штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ к перевиваемой культуре клеток ВНК-21. В результате проведенной работы был получен модифицированный штамм вируса бешенства, который был обозначен как «RV-97» [16, 17, 18,].

Однако в доступной литературе не приведен количественный анализ процесса адаптации вируса, позволяющий объективно оценить время (количество пассажей), необходимое для того, чтобы считать данный вирус адаптированным к заданной системе культивирования [6, 7, 8, 14, 16].

Цель настоящей работы состояла в адаптации вируса бешенства штамма «RV-97» к перевиваемой клеточной линии почки сирийского хомячка (ВНК-21) Шведской сублинии, а также – в проведении сравнительного анализа накопления вируса на различных пассажах.

Материалы и методы исследований

Антигенный материал. В работе использовали 10 % надосадочную вирусосодержащую

жидкость штамм «RV-97» вируса бешенства, полученную из головного мозга овец, депонированную в Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Хранение производилось при температуре не выше минус 70°C в соответствии с требованиями СП 1.2.036-95.

Культура клеток. С целью изучения культуральных свойств вируса бешенства штамма «RV-97» и его адаптацию использовали высокотехнологичную монослойную перевиваемую клеточную культуру почек сирийского хомячка, клон 13 (Beby hamster kidney cell) ВНК-21/13 Шведская линия.

Подсчет клеток при посеве проводили в автоматическом счетчике клеток или в камере Горяева по формуле: $A: 3 \times 15 \times 10000$, где А: 3 – среднее арифметическое количество клеток в одном горизонтальном ряду больших квадратов; 9 и 15 – постоянные коэффициенты; 10000 – коэффициент перевода в объем 1,0 см³.

После инкубации флакон с вирусной суспензией замораживали при минус 70°C.

Определение титра инфекционной активности вируса бешенства. Проводили с применением высокочувствительной монослойной клеточной линии ВНК-21 [12]. Для этого после

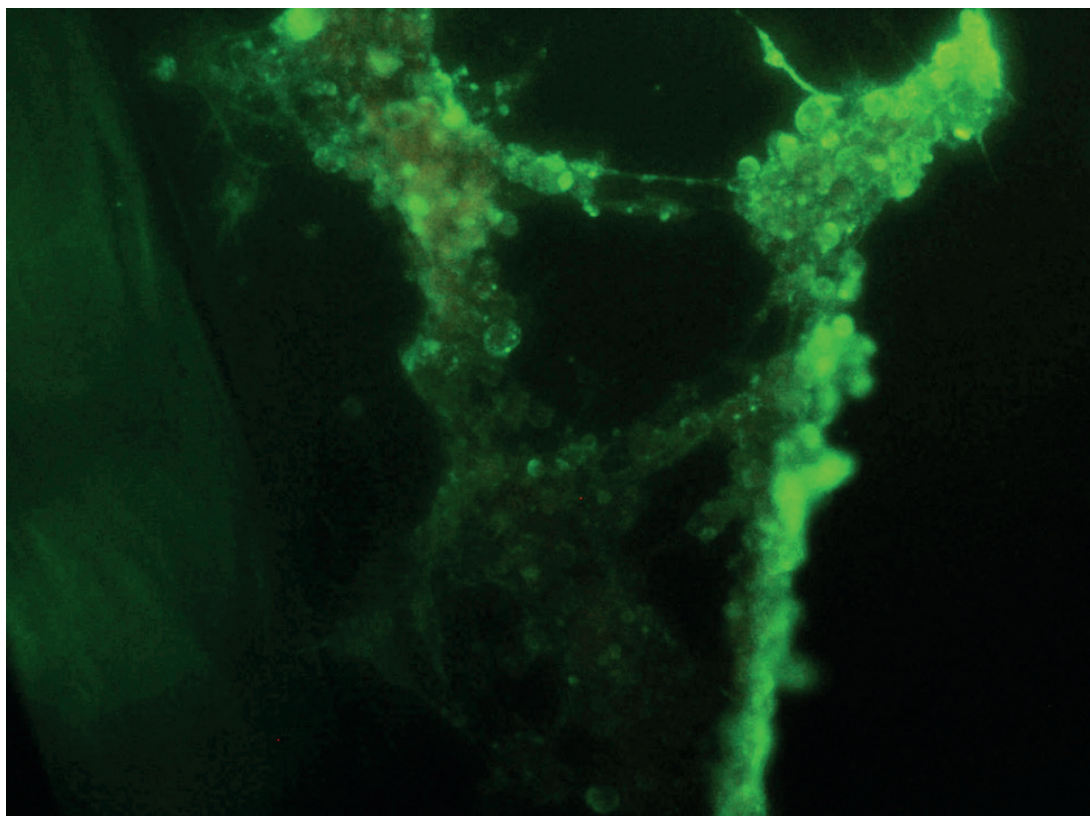


Рис.2. Наличие фокусов флюоресценции вируса бешенства штамм «RV-97» в культуре клеток ВНК 21/13 после 48 часов культивации в реакции флуоресцирующих антител. Флуоресцентный микроскоп. Объектив $\times 200$.

фиксации охлажденным 80% водным раствором ацетона клеточный монослой окрашивали антирабическим ФИТЦ иммуноглобулином G меченный флуоресцеинизотиоцианатом натрия в рабочем разведении 1:100 и просматривали в полях зрения флуоресцентного микроскопа при увеличении $\times 200$. Реакцию учитывали по принципу «все-или-ничего». Лунка считается положительной при обнаружении групп клеток (фокусов) или единичных клеток с характерными для бешенства округло-овальными внутриклеточными включениями разной величины и с четкими краями, светящихся ярким зеленым или желтовато-зеленым светом на темном или светлом серо-зеленом фоне неинфицированных клеток. Отрицательной считается реакция при отсутствии специфического свечения. Значения титра вируса бешенства вычисляли с использованием метода Спирмена-Кербера [19] и выражали в $Ig\text{ ККИД}_{50}/\text{см}^3$.

Статистическая обработка данных. Использовали стандартные методы обработки выборок варьирующих переменных. Определяли

существенность различий средних величин. С этой целью использовали метод множественных сравнений Шеффе [20]. Различия считали статистически достоверными на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Определяли число пассажей, которые необходимо было провести для адаптации штамма «RV-97» к монослойной культуре клеток ВНК-21.

Концентрация клеток ВНК-21/13 линий при посеве составляла 100-150 тыс/см³. В работе использовали 2-х суточную культуру клеток ВНК-21, находящуюся в фазе логарифмического роста (80-90% монослой). Использовали клеточный монослой, выращенный на пластиковых культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см². Монослой выращивали на питательной среде ПСП или Игла в модификации ФГУ «ВНИИЗЖ», с добавлением 10% сыворотки КРС и глутамина (0,292 г/л). Для проведения каждого пассажа вируса использовали не менее 6 культуральных флаконов. Для контроля состо-

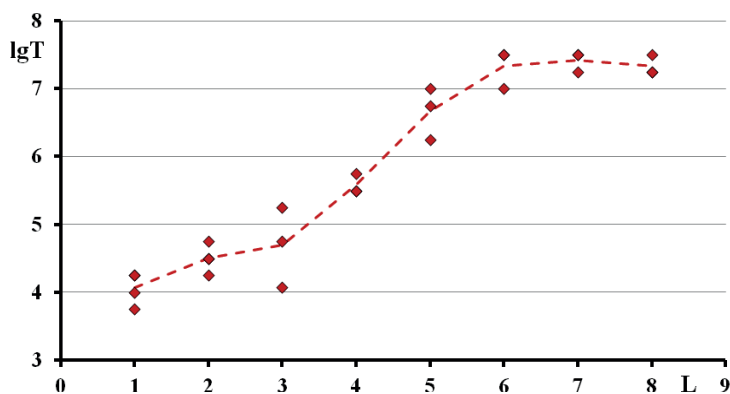


Рис. 3 – Оценки титров инфекционного вируса бешенства штамма “RV-97” (♦ - T, ККИД 50/см³), установленные соответственно номерам последовательных пассажей (L), проведенных на монослойной культуре клеток ВНК-21/13. Пунктиром показана средняя тенденция.

яния монослоя в опытах параллельно оставляли интактными менее 3 флаконов с культурой клеток.

Инфицирующий материал в объеме 0,1-1 см³ вносили на освобожденный от среды монослой, множественность заражения составляла 0,01-0,1 ККИД₅₀/кл. Инокулят экспонировали в течение 30 мин при температуре (37,0±1,0)°C, периодически покачивали флаконы. Далее, ин-

фицированный монослой отмывали одним объемом питательной среды, после чего во флаконы вносили поддерживающую среду. В контрольную группу флаконов вместо вирусного материала вносили 1 см³ питательной среды.

Культивирование вируса в монослое продолжали в течение 48–72 ч (Рис.1) Время культивирования определяли по сохранению структурной целостности монослоя в контрольной группе флаконов. Интактный монослой считали структурно-целостным, если было сохранено не менее 75% морфологически полноценных клеток (т.е. допускали наличие не более 25% не специфически дегенерированных или отслоившихся клеток). Смену ростовой и поддерживающей среды проводили в зависимости от уровня пассажа, через каждые 24 и 48 часов. Специфические изменения в клетках и монослое не происходили при взаимодействии с вирусом.

По окончании культивирования флаконы инфицированным монослоем промораживали для деадгизирования его от ростовой поверхно-

Таблица 1

Результаты сопоставления средних логарифмических значений инфекционных титров (lg 'T, ККИД50/см³) вируса бешенства штамма “RV-97”, уставленных соответственно номерам пассажей (L) проведенных на монослойной к.к. ВНК-21/13 (Шведская линия)

Статистические коэффициенты (F)* для данной пары сопоставляемых значений lg 'T									
L	lg 'T(Q; n)	lg 'T							
		4,063	4,5	4,692	5,583	6,667	7,333	7,417	7,333
1	4,063 (0,172; 4)	-	-	-	-	-	-	-	-
2	4,5 (0,125; 4)	0,62	-	-	-	-	-	-	-
3	4,692 (0,695; 3)	1,11	0,09	-	-	-	-	-	-
4	5,583 (0,042; 3)	6,46**	2,87	1,94	-	-	-	-	-
5	6,667 (0,292; 3)	18,97	11,48	9,55	2,88	-	-	-	-
6	7,333 (0,167; 3)	29,92	19,62	17,07	7,50	1,09	-	-	-
7	7,417 (0,042; 3)	31,47	20,80	18,18	8,23	1,38	0,01	-	-
8	7,333 (0,042; 3)	29,92	19,62	17,07	7,50	1,09	0,00	0,01	-
Примечания:									
*	$F_{1,2} = (lg'T_1 - lg'T_2)^2 / (D/n_1 + D/n_2)$, где: $D = ((\sum Q_i) \times (k-1)) / (\sum n_i - k)$; Q – сумма квадратов отклонений выборки; n – число элементов в выборке; k – число выборок;								
**	цветом выделены ячейки с коэффициентами, для которых выполняется неравенство $F \geq F_{p=0,05} = 2,41$, где F_p – критериальный коэффициент Фишера соответственно заданного уровня p для $v_1 = k-1$ и $v_2 = \sum n_i - k$.								

сти и дезинтеграции клеток, затем размороженное содержимое, соблюдая условия асептики, объединяли. Далее клеточный детрит осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 10–15 мин. Полученный супернатант считали осветленным вирусным материалом (данного пассажа) и использовали для дальнейшей работы.

На следующем этапе работы в образцах осветленного вирусного материала определяли инфекционный титр вируса. В качестве тест-системы для определения инфекционной активности использовали культуру клеток ВНК-21, выращенную в виде монослоя в лунках плоскодонных пластиковых планшетов. Для индикации инфицированных клеток использовали флюоресцентную метку. Соответственно испытанным разведениям вирусного материала регистрировали наличие фокусов флюоресценции (Рис. 2). В лунках отрицательного контроля при проведении титрования специфического свечения не обнаруживается. Видимое поле лунки имеет темный цвет.

Культивирование вируса продолжали в течение восьми пассажей. Показателем степени адаптации вируса на данном пассаже считали величину его инфекционного титра в соответствующем образце. Полученные результаты использовали для анализа, целью которого являлось определение наименьшего числа пассажей (L), после которого величина IgT статистически стабилизировалась (т.е. выполнялось условие, что $IgT_L \approx IgT_{L+1}$). Логарифмическую величину титра (IgT) рассчитывали по формуле Спирмена-Кербера в единицах $ККИД_{50}/см^3$.

Полученные результаты в виде оценок инфекционных титров вируса, установленных соответственно проведенным пассажам приведены на рисунке 3.

Диаграмма, представленная на рисунке 1, иллюстрирует возрастание инфекционного титра вируса в культуральной жидкости по мере увеличения количества проведенных пассажей. От начала процедуры адаптации до шестого пассажа накопление вируса возросло более чем на 3 порядка. Дальнейшие пассажи не обнаружили видимого увеличения показателей титра инфекционного вируса.

Далее проводили последовательное парное сопоставление всех полученных оценок титров в неповторяющихся комбинациях, результаты которого представлены в таблице 1.

Приведенные в таблице 1 результаты сопоставления значений $Ig'T$ показывают, что (для принятого $p=0,05$) в интервале $L_1 \div L_3$ достоверного увеличения титра не происходило ($Ig'T_{L_1}=4,063 \approx Ig'T_{L_3}=4,692$). Далее, до шестого пассажа, вирус демонстрировал интенсивный прирост титра ($Ig'T_{L_6}=7,333$). Следующие пассажи статистических изменений величины инфекционного титра не показали.

Было сделано заключение, что вирус бешенства штамма “RV-97” 6-го пассажа можно считать адаптированным к монослойной культуре клеток ВНК-21/13.

Обсуждение

Для репродукции вируса бешенства использование перевиваемых клеточных культур имеет большую значимость. Развитие систем клеточных культур для размножения вирусов привело к значительным успехам в разработке вирусных вакцин. Клеточная линия ВНК-21 является широко применяемой в отечественной практике и уже более 30 лет используется для производства вакцинных препаратов против вируса бешенства для животных.

В доступной литературе не приведен количественный анализ процесса адаптации вируса, позволяющий объективно оценить время (количество пассажей), необходимое для того, чтобы считать данный вирус адаптированным к заданной системе культивирования.

Проведено исследование по адаптации вакцинного штамма вируса бешенства “RV-97” в течение 8 последовательных пассажей к монослойной сублинии культуры клеток ВНК-21/13 Шведской линии с целью дальнейшего применения в научной и производственной практике. В результате определения существенности различий средних величин методом множественных сравнений Шеффе дали оценку логарифмическим значениям инфекционных титров ($Ig'T$, $ККИД_{50}/см^3$) вируса бешенства штамма “RV-97” в монослойной культуре клеток ВНК-21 и показали наименьшее числа пассажей (L), после

которого величина IgT статистически стабилизировалась.

Заключение

Определено наименьшее число пассажиров, при котором вирус бешенства штамм «RV-97» является адаптированным к перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13 Шведской сублинии на уровне 6 пассажа.

Установлено, что титр инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма «RV-97» на уровне 6 пассажа составляет $7,33 \pm 0,17 \text{ Ig ККИД}_{50} / \text{см}^3$.

Библиографический список

1. Макаров, В.В. Современные представления о бешенстве 2018 г. / В.В. Макаров // Вестник охотоведения. – 2018. – Т.15, № 3. – С. 215-227.
2. Оценка эффективности противоэпизоотических мероприятий против бешенства, осуществляемых в Российской Федерации / С.В. Щербинин, Т.В. Вадопалас, Ф.И. Коренной [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2020. – №3 (34). – С. 162-167.
3. Introduction history of rabies control by vaccination / A.C. Banyard, L.M. McElhinney, N. Johnson, A. R. Fooks // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2018. – Vol. 37, № 2. – P. 305-322.
4. Груздев, К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, А.Е. Метлин. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. – 394 с.
5. Пероральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства в Беларуси (обзор) / Н.А. Ковалев, Д.В. Бучукури, Ю.В. Ломако [и др.] // Экология и животный мир / 2020. – № 2. – С. 42-51.
6. Лаптева, О.Г. Усовершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против бешенства: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Лаптева Оксана Георгиевна. – Покров, 2003. – 113 с.
7. Волкова, А.В. Культивирование вируса бешенства штамма Внуково-32 в культуре перевиваемых клеток для производства антирабических вакцин: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Волкова Аэлита Витальевна. – М., 1997. – 20с.
8. Гочмурадов, М.Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной культуральной вакцины против бешенства: автореф. дис. ... канд. наук: 16.00.03 / Гочмурадов Мурад Газакович. – Владимир, 1999. – 23 с.
9. Выращивание вируса бешенства в культурах клеток различного происхождения / В.А. Балабанов, Т.В. Сологуб, И.В. Никишин [и др.] // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: тез. докл. науч. конф. – Покров, 1990. – С. 120-122.
10. Development of a new purified VERO cell rabies vaccine (Rabivax-S) at the serum institute of India Pvt Ltd / S. P.Kulkarni, A. Sahai, B. Gunale, R.M. Dhere // Expert Rev Vaccines. – 2017. – Vol. 16, № 4. – P. 303-311.
11. King, A.A. Culture of rabies virus in vitro / A.A. King // Rabies. – Boston: Kluwez Acad. Publ, 1988. – P. 47-66.
12. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 3.1.17. – Rabies (infection with rabies virus) and other lyssaviruses. – Paris, 2018. – P. 1-35.
13. Molecular and immunogenic characterization of ВНК-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy / C.A. Patel, V. Upmanyu, S. Ramasamy [et al.] // Virusdisease. – 2015. Vol. 26, № 4. – P. 288-296.
14. Сливко, И.А. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов ТС-80 и 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ вируса бешенства: автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / Сливко Игорь Александрович. – Покров, 2003. – 22 с.
15. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines / P.N. Barrett, W. Mundt, O.Kistner, M.K. Howard // Expert Rev. Vaccines. – 2009. – Vol. 85. – P. 607-618.
16. Борисов, А.В. Разработка технологии изготовления вирусвакцины против бешенства диких плотоядных: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Борисов Алексей Валерьевич. – Владимир, 2003. – 22 с.
17. Груздев, Л.К. Изучение репродукции фиксированного штамма в культурах клеток /

Л.К. Груздев, А.Е. Дешевых, К.Н. Груздев // Вопросы прикладной экологии (природопользования), охотоведения и звероводства. – Киров, 1997. – С. 285-286.

18. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97 / A. Metlin, L. Paulin, S. Suomalainen [et al.] // Virus Research. – 2008. – Vol. 132. – P. 242-247.

19. Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза-эффект» с альтернативным способом оценивания / В.Ю. Кулаков, С.Н. Колосов, А.В. Константинов (и др.). – Владимир: ФГБУ ВНИИЗЖ, 2016. – 31 с.

20. Поллард, Д. Справочник по вычислительным методам статистики / Д. Поллард. – М.: Финансы и статистика, 1982. – С.182-184.

ADAPTATION DYNAMICS OF THE RABIES VIRUS OF “RV-97” VACCINE STRAIN TO MONOLAYER VNK-21/13 CELL CULTURE

Shishkov A. V. Pyatkina A. A., Manin B. L.
FSBI “ARRIAH” Federal Center for Animal Health 600901,
Vladimir, Yuryevets md., tel. 8 (4922) 26-06-14, tel / fax 26-15-73, e-mail: mail@arriah.ru

Key words: adaptation, rabies, RV-97 strain, cell culture, VNK -21, infectious activity, cell culture infectious dose CCID₅₀ / cm³.

The problem of rabies as one of the most dangerous zoonoses continues to be relevant almost all over the world. In development of a live vaccine, an important stage is to obtain an active component - a virus that retains the given phenotypic properties, pathogen cultivation system plays the main role. The aim of this work was to adapt the rabies virus of “RV-97” strain to the finite cell line of the Syrian hamster kidney (VNK -21/13) of the Swedish subline, as well as to carry out a comparative analysis of virus accumulation at different passages. The number of passages that need to be carried out for adaptation of RV-97 strain to the monolayer culture of VNK -21/13 cells was determined. We used a 2-day culture of VNK -21/13 cells in the phase of logarithmic growth (80-90% formation of a cell monolayer). VNK -21/13 cell culture grown as a monolayer in the wells of flat-bottomed plastic plates was used as a test system for infectious activity. A fluorescent label was used to indicate infected cells. It was determined that the smallest number of passages at which the rabies virus of “RV-97” strain is adapted to the finite cell culture of VNK -21/13 of the Swedish subline is the 6th passage level. It was found that the titer of infectious activity of attenuated rabies virus of “RV-97” strain at the 6th passage level is $7.33 \pm 0.17 \lg \text{CCID}_{50} / \text{cm}^3$.

Bibliography:

1. Makarov, V. V. Current concepts about rabies in 2018 / V. V. Makarov // Vestnik of hunting studies. - 2018. - Vol.15, № 3. - P. 215-227.
2. Evaluation of effectiveness of anti-epizootic measures against rabies, carried out in the Russian Federation / S. V. Shcherbinin, T. V. Vadopalas, F. I. Korennoy [and others] // Veterinary medicine today. - 2020. - № 3 (34). - P. 162-167.
3. Introduction history of rabies control by vaccination / A. C. Banyard, L. M. McElhinney, N. Johnson, A. R. Fooks // Rev. Sci. Tech. OIE. - 2018. - Vol. 37, № 2. - P. 305-322.
4. Gruzdev, K.N. Animal rabies / K.N. Gruzdev, A.E. Metlin. - Vladimir: FSBI ARRIAH, 2019. - 394 p.
5. Oral vaccination of wild carnivores against rabies in Belarus: a review / N. A. Kovalev, D. V. Buchukuri, Yu. V. Lomako [et al.] // Ecology and animal world. - 2020. - № 2. - P. 42-51.
6. Lapteva, O.G. Technology improvement of production inactivated rabies vaccine: spec. 16.00.03: dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences / Lapteva Oksana Georgiev. - Pokrov, 2003. - 113 p.
7. Volkova, A. V. Cultivation of the rabies virus of Vnukovo-32 strain in the culture of finite cells for production of anti-rabies vaccines: spec. 03.00.06: author's abstract of dissertation for the degree of candidate of biological sciences / Volkova Aelita Vitalievna. - Moscow, 1997. - 20p.
8. Gochmuradov, M.G. Technology improvement of industrial production of inactivated cultural vaccine against rabies: spec. 16.00.03: author's abstract of dissertation for the degree of candidate of sciences / Gochmuradov Murad Gazakovich. - Vladimir, 1999. - 23 p.
9. Cultivation of the rabies virus in cell cultures of various origins / V. A. Balabanov, T. V. Sologub, I. V. Nikishin [and others] // Questions of veterinary virology, microbiology and epizootology: abstracts of the scientific conference. - Pokrov, 1990. - P. 120-122.
10. Development of a new purified VERO cell rabies vaccine (Rabivax-S) at the serum institute of India Pvt Ltd / S. P. Kulkarni, A. Sahai, B. Gunale, R. M. Dhere // Expert Rev Vaccines. - 2017. - Vol. 16, № 4. - P. 303-311.
11. King, A. A. Culture of rabies virus in vitro / A. A. King // Rabies. - Boston: Kluwe Acad. Publ, 1988. P. 47-66.
12. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus) and other lyssaviruses. - Paris, 2018. - P. 1-35.
13. Molecular and immunogenic characterization of BHK-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy / C. A. Patel, V. Upmanyu, S. Ramasamy [et al.] // Virusdisease. - 2015. - Vol. 26, № 4. - P. 288-296.
14. Slivko, I.A. Immunobiological properties of TS-80 and 71 BeNIIEV-VGNKI vaccine strains of rabies virus: spec. 16.00.03: author's abstract of dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences / Slivko Igor Aleksandrovich. - Pokrov, 2003. - 22 p.
15. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines / P. N. Barrett, W. Mundt, O. Kistner, M. K. Howard

// Expert Rev ... Vaccines. - 2009. - Vol. 85. - P. 607-618.

16. Borisov, A. V. Technology development for production of virus vaccines against rabies of wild carnivores: spec. 16.00.03: author's abstract of dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences / Borisov Aleksey Valerievich. - Vladimir, 2003. - 22 p.

17. Gruzdev, L.K. Study of reproduction of a fixed strain in cell cultures / L.K. Gruzdev, A.E. Deshevykh, K.N. Gruzdev // Issues of applied ecology (nature management), hunting and fur farming. - 1997. - P. 285-286.

18. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97 / A. Metlin, L. Paulin, S. Suomalainen [et al.] // Virus Researh. - 2008. - Vol. 132. - P. 242-247.

19. Methodical recommendations for analysis of parameters in the "dose-effect" systems with an alternative method of assessment / V. Yu. Kulakov, S. N. Kolosov, A. V. Konstantinov [and others]. - Vladimir: FSBI ARRIAH, 2016. - 31 p.

20. Pollard, D. Reference book of computational methods of statistics / D. Pollard. - Moscow: Finance and Statistics, 1982. - P.182-184.