**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТУ**

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫ**

**ТООКЕН ФИЗИОЛОГИЯ ЖАНА МЕДИЦИНА ИНСТИТУТУ**

Диссертациялык кеңеш Д 03.20.607

Кол жазма катары

УДК 578.824.11: 615.371: 57.083.2

**ЕРШЕБУЛОВ ЗАКИР ДЖАПАРОВИЧ**

# Жапайы жырткыч жаныбарлардын оозу аркылуу берилүүчү кутурмага каршы вакцинаны өндүрүүнүн технологиясын өркүндөтүү

03.01.06 – биотехнология

Автореферат
биология илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасын

изденип алуу үчүн жазылган диссертациясы

**Бишкек – 2021**

Иш Казакстан Республикасынын Билим берүү жана илим министрлигинин Илимий комитетинин «Биологиялык коопсуздук маселелери илимий-изилдөө институту» РМКда жана КР Улуттук илимдер академиясынын биотехнология Институтунда жүргүзүлдү.

| | |
|---|---|
| **Илимий жетекчиси:** | **Жунушов Асанкадыр Темирбекович**<br>Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын академиги, ветеринария илимдеринин доктору илимпоз, профессор, биотехнология институтунун директору |
| **Расмий оппоненти:** | **Гринь Светлана Анатольевна**<br>биология илимдер доктору, профессор, Россия илимдер академиясынын мүчө-корреспонденти, «Биологиялык өнөр жайдын бүткүл россиялык илимий-технологиялык институту» федералдык мамлекеттик бюджеттик илимий мекемесинин директорунун орунбасары<br>**Керимжанова Бахытжан Фазылжановна,** ветеринария илимдер доктору, профессор, Казак айыл чарба илимдер академиясынын академиги инфекцияга каршы препараттар боюнча Алмата илимий борборунун эл аралык байланыштар бөлүмүнүн жетекчисинин орун басары |
| **Жетекчи уюм:** | Тажикстан Республикасынын айыл чарба илимдер академиясы биологиялык коопсуздук жана биотехнология проблемалар институту (734025, Тажикстан Республикасы, Душанбе, Рудаки пр., 21). |

Диссертацияны коргоо «28» январь 2021-жылы саат 14.00дө Д. 03.20.607 Биология илимдеринин кандидатынын (докторунун) илимий даражасын алуу үчүн диссертацияларды коргоо диссертациялык кеңешинин отурумунда Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын биотехнология институту жана Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын тоо-кен физиологиясы жана медицина институту менен биргеликте болот. 720071, Бишкек ш., Чүй пр., 265а, 303 дареги Видеоконференцияга кирүү шилтемеси - https: /vc/vak.kg/b/d_0-hz5-j9k-ng6

Диссертация менен КР УИАнын биотехнология институтунун (720071, Бишкек ш., Чүй пр., 265а), тоо-кен физиологиясы жана медицина институтунун китепканаларынан таанышууга болот. Кыргыз Республикасы (720048 Бишкек, Анкара көч. 1/5) жана http : //vak.kg/rcl-groups/dissertacionnyy-sovet-d-03-20-607// сайтында

Диссертациялык кеңештин илимий катчысы,
биология илимдеринин доктору, профессор,
УИА корреспондент мучосу Б.М. Худайбергенова

## ИШТИН ЖАЛПЫ МҮНӨЗДӨМӨСҮ

**Диссертациянын темасынын актуалдуулугу.** Кутурма – вирус козгогон зооноз (жаныбарлардан адамга жугуучу оору). Оору үй жана жапайы жаныбарларга жугат жана ылаңдаган мал менен тыгыз байланышта болгон адамга да жугат, көбүнчө шилекей аркылуу, тиштеп же жаракат алганда өлүмгө алып келүү коркунучу бар. ДСУнун маалыматы боюнча, бул оору эң чоң экономикалык зыян алып келген беш зооантропоноздун бири. Жыл сайын дүйнөдө кутурмадан 59 миңге жакын адам өлөт, анын 35 172си Азияда. Кутурма оорусунун татаал эпидемиологиялык жана эпизоотиялык абалы дүйнөнүн 110дон ашык өлкөсүндө байкалган, бирок өлүмдүн 95%дан ашыгы Азия жана Африка өлкөлөрүнө туура келет.

Дүйнөдө азыркы этапта кутурма оорусунун көбөйүшү байкалууда, Казакстанда да ушундай эле көрүнүш өсүүдө, жаныбарларда (түлкү, енот ит, карышкыр, мышык жана бодо мал) катталган кутурма оорусунун орточо өсүү тенденциясы байкалууда, жылдык орточо чен 7% түзөт. Республикада кутурмадан 700 башка чейин айыл чарба жаныбарлары өлөт, анын 50%дан ашыгы жыл сайын бодо малга, 25%га чейин майда мүйүздүү малдарга туура келет.

А.А.Росляковдун, Г.А.Коломакиндин, И.Л.Квасовдун, Ш.Н.Турсункуловдун айтымында Казакстан менен Кыргызстанда кутурма оорусунун негизги булагы жапайы жырткычтар, биринчи кезекте түлкү жана карсак болуп саналат. Оорунун таралышынын негизги вектору кутурма менен үй жаныбарларына жана адамдарга түздөн-түз же ит-мышык аркылуу жугушу мүмкүн.

Эл аралык тажрыйба көрсөткөндөй, түлкүлөрдүн жана башка жапайы жырткычтардын популяцияларында бул инфекциянын очокторун жок кылмайынча ооруну жок кылуу мүмкүн эмес. Айыл чарба жаныбарларындагы кутурманын циклдик мүнөзү жапайы жырткычтардын (түлкү, карсак ж. б.) популяциясынын санына түздөн-түз байланыштуу. Популяциянын санынын бир деңгээлге кыскарышы менен бирге, кутурма оорусунун жайылышын алдын алуу жана түрлөрүн сактоону камсыз кылууга көңүл бурууну күчөтүү зарыл, жапайы жаныбарлардын арасында кутурмага каршы вакцина гана оорудан алдын алат, дарыны табигый жол менен камсыз кылуу, башкача айтканда жаныбарлардын вакцинаны жем аркылуу жеп кабыл алуусу.

Табиятта кутурмага каршы күрөшүү үчүн кутурмага каршы ооз аркылуу берилүүчү вакциналар иштелип чыгып, ийгиликтүү колдонулууда. Кутурмага каршы ооз аркылуу берилүүчү вакциналарды өндүрүү

технологиясы боюнча ата мекендик иштеп чыгуулардын жоктугу, ал эми импорттук вакциналардын кымбаттыгы жапайы жырткычтардын кутурма оорусуна каршы күрөшүүнүн эффективдүү ыкмасын киргизүүнү жана Казакстан менен Кыргызстанда гидрофобияны жок кылуу аракетин кечеңдетүүдө. Жогорудагы көйгөйлөр өтө актуалдуу болуп саналат жана жапайы жырткычтар үчүн ооз аркылуу берилүүчү кутурмага каршы маданий вакцинаны түзүү, масштабдоо жана сыноо боюнча иштер негизги болуп саналат.

**Диссертациянын темасынын негизги илимий программалар менен байланышы, илимий мекемелер жүргүзгөн негизги изилдөө иштери.** Диссертациялык иш төмөнкү темадагы илимий долбоордун алкагында аткарылган: «Кооптуу оору козгогучтарды ташуу үчүн эпидемиялык актуалдуу аймактардагы жапайы фаунага мониторинг, изилдөө жүргүзүү жана Казакстан Республикасынын биологиялык коопсуздугун камсыз кылуу боюнча комплекстүү профилактикалык иш-чараларды иштеп чыгуу» (# мамлекеттик каттоо 0153 / PCF-14-OT) 2013-2015-жылдарга максаттуу каржылоо Казакстан Республикасынын Билим берүү жана илим министрлигинин илим комитетинин колдоосу менен, ошондой эле 2018-2020-жылдарга «Жаныбарлардын кутурма оорусуна каршы инактивдештирилген вакцинаны коммерциялаштыруу» темадагы программасы боюнча: «Казакстан Республикасынын аймагынын ветеринардык коопсуздугу: эпизоотологиялык мониторинг, сыноо, спецификалык алдын алуучу каражаттарды коммерциялаштыруу жана өзгөчө кооптуу инфекциялык оорулардын диагностикасын аныктоо» (Мамлекеттик каттоонун № О.0878 ИРК BR06249226).

**Изилдөө максаты:** Иштин негизги максаты – жапайы жырткыч жаныбарлардын арасында кутурма оорусунун алдын алуу үчүн кутурмага каршы вакцинаны өндүрүү технологиясын жакшыртуу, сыноо жана өндүрүү болуп саналат.

**Изилдөө максаты:**

1. Тажрыйба жүргүзүү үчүн ар түрдүү чөйрөлөрдү даярдоо;
2. Кутурма вирусун жана клеткалардын суспензия культивациялоосунун оптималдуу параметрлерин иштеп чыгуу;
3. Ири масштабдагы культивациалоодо вирустун кайталануусун текшерүү;
4. Жапайы жаныбарларды ооз аркылуу берилүүчү эмдөө үчүн жемдин (приманка) оптималдуу курамын тандоо;
5. Кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын ар кандай ыкмалар менен коопсуздугун изилдөө;

6. Кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын иммуногендик касиеттерин изилдөө;

7. Жапайы жырткыч жаныбарларда ооз аркылуу берилүүчү вакцинанын натыйжалуулугун жана коопсуздугун баалоо.

**Илимий иштин жаңылыгы.** ВНК-21с13 клеткалары үчүн оптималдуу чөйрө тандалып алынган. Клетка суспензиясын жана кутурма вирусун өстүрүүнүн оптималдуу параметрлери иштелип чыккан.

Кеңири масштабда культивациялап өстүрүүдө вирустун кайталанышы аныкталды. Жапайы жаныбарларды ооз аркылуу эмдөө үчүн жемдин оптималдуу курамы тандалып алынган. Кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын коопсуздугу ар кандай ыкмаларда изилденген. Кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын иммуногендик касиеттери изилденген. Жапайы жырткычтарга ооз аркылуу берилүүчү вакцинанын эффективдүүлүгүн жана коопсуздугун баалоо иштери жүргүзүлгөн.

**Алынган натыйжалардын практикалык мааниси.** Жапайы жырткычтардын кутурма оорусуна каршы вакцинаны даярдоонун далилденген технологиясы БКМИИде кутурмага каршы вакцинаны өндүрүүдө колдонууга сунушталат. Жүргүзүлгөн изилдөө иштеринин жыйынтыгы менен «Жапайы жырткыч жаныбарлардын кутурма оорусуна каршы оозеки кутурма штаммына вакцина жасоо ыкмасына» No101894 автордук күбөлүк алынган;

- «Жаныбарлардын кутурма оорусунун алдын алуу үчүн инактивдештирилген оозеки кутурма вакцинасын даярдоо ыкмасына» №99704 ойлоп табуучу күбөлүгү алынган;

- жаныбарлардын кутурма оорусуна каршы инактивдештирилген вакцина [СТ 405-1919-04 ГП-109-2018], өндүрүү жана контролдоо боюнча нускама, колдонуу боюнча маалымат], БКМИИнин башкы директору тарабынан бекитилген жана Казакстан Республикасынын айыл чарба министрлиги, Ветеринардык көзөмөл жана контролдоо комитети менен макулдашылган.

**Алынган натыйжалардын экономикалык мааниси.** Иштин натыйжалары жапайы жырткычтар арасында кутурма оорусун алдын алуу үчүн вакцинаны коммерциялаштырууда колдонулушу мүмкүн, бул көп учурда кымбат алынып келинүүчү кутурмага каршы кабыл алынган вакциналардан баш тартууга мүмкүндүк берет.

**Коргоо үчүн берилген диссертациянын негизги жоболору:**

1. ВНК-21с13 клетка культурасында кутурма вирусунун VRC-RZ2 штаммынын суспензия культивациясынын параметрлерин оптималдаштыруу.

2. Ири культивацияда вирустун кайталанышы.

3. Жапайы жаныбарларды ооз аркылуу эмдөө үчүн жемдин оптималдуу курамы.

4. Жаныбарларды ооз аркылуу иммунизациялоо үчүн VRC-RZ2 штаммынан кутурмага каршы вакцинаны өндүрүү технологиясы.

5. Кутурма вирусунун VRC-RZ2 культурацияланган вакцина штаммынын иммунобиологиялык касиеттери.

6. Кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын ар түрдүү ыкмаларындагы коопсуздугу.

7. Жапайы жырткычтар үчүн ооз аркылуу берилүүчү вакцинанын натыйжалуулугун жана коопсуздугун баалоо.

**Изилдөөчүнүн жеке салымы.** Диссертациянын бардык бөлүмдөрү автор тарабынан өз алдынча аткарылган. Иштин өзүнчө этаптары илимий кызматкер Далбаев Н.К., биология илимдеринин магистри Таранов Д.С., биология илимдеринин кандидаты Жилин Е.С. менен биргеликте аткарылган, бул үчүн автор жогоруда аты аталган адамдарга чын жүрөктөн ыраазычылыгын билдирет.

**Изилдөө натыйжаларын апробациялоо.** Изилдөөлөрдүн натыйжалары илимий конференцияларда айтылды:«Биологиялык коопсуздукту камсыз кылууда илимди инновациялык өнүктүрүү» БКМИИдин түзүлгөн күнүнө арналган II Эл аралык жаш окумуштуулардын илимий конференциясы, пгт.Гвардейский, 2014; КР БКМИИ КН РМК Илимий кеңешинин жыйналыштарында, ошондой эле Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын биотехнология институтунун Илимий кеңешинин жыйналыштарында.

**Диссертациянын жыйынтыктарынын басылмаларда чагылдырылышынын толуктугу.** Диссертациянын темасы боюнча 20 илимий эмгек жарык көргөн, анын ичинен 1 макала Thomson Reuters рецензияланган журналында, 2 макала РИНЦке кирген журналдарда, 2 эл аралык конференциялардын материалдарында, ошондой эле ойлоп табууга 2 патент жана иштелип чыккан - 1 НТД.

**Диссертациянын структурасы жана көлөмү.** Диссертация компьютердик жазууда 172 бет көлөмүндө берилген жана төмөнкү бөлүмдөрдү камтыйт: киришүү, адабияттарды карап чыгуу, өздүк изилдөөлөрдүн натыйжалары жана аларды талкуулоо, корутундулар, практикалык сунуштар, колдонуу. Иш 20 таблица жана 20 цифра менен иллюстрацияланган. Колдонулган адабияттардын тизмесине 238 адабият кирди, анын ичинен 124 чет тилинде. Тиркемелер алынган натыйжалардын ишенимдүүлүгүн ырастаган документтерди камтыйт.

## ИШТИ НЕГИЗГИ МАЗМУНУ

**Киришүү изилдөө темасынын актуалдуулугун** жапайы жырткычтарга колдонуу үчүн кутурмага каршы маданий вакцинаны түзүү, масштабдоо жана сыноо боюнча иштердин зарылдыгын негиздейт.

**1-главада «Адабияттардын обзору»** Ата мекендик жана чет элдик басылмалардын материалдарынын негизинде оорунун кыскача тарыхы, кутурма оорусунун козгогучунун биологиялык касиеттеринин мүнөздөмөлөрү, Кыргызстандагы жана Казакстандагы оорунун эпизоотиялык абалын талдоонун натыйжалары берилген жана кошуна мамлекеттер да. Клетка культураларында кутурма вирусунун көбөйүүсүнө ыңгайлашуу ыкмаларынын мүнөздөмөлөрү, кутурмага каршы оозеки вакциналардын мүнөздөмөлөрү жана аларды өндүрүү технологиялары, ошондой эле диагностикалык методдор, сапатты көзөмөлдөө жана дары-дармектердин натыйжалуулугун баалоо берилген.

**2-главада «Изилдөөнүн материалдары жана методдору»** изилдөө объекттеринин мүнөздөмөлөрү жана изилдөөлөрдү ишке ашыруунун методологиялык жолдору берилген. Иш 2013-2020-жылдар аралыгында КР БКМИИ КН РМКнын вирустарды өстүрүү технологиялары жана биологиялык продуктулардын даяр формаларынын технологиясы лабораторияларында жүргүзүлдү.

Биз кутурма вирусунун штаммдарын колдондук: "VRC-RZ2" жана эталондук штамм "CVS". Клетка культуралары: баштапкы-трипсинделген - ПЯ, үзгүлтүксүз - BHK-21 / c13, ПС, МДВК, Vero, ПЩ.

Штаммдын биологиялык касиеттери жана вакцинанын прототиптери лабораториялык ак чычкандарда, коёндордо, койлордо, ар кандай курактагы иттерде, түлкү жана карышкырларда текшерилди.

*Методдор.*

*Клетка чөйрөсүндө вирусту культивациялоо.* Вирусту культивациялоо BHK-21/sc13, ПС клеткаларын өстүрүүнүн стационардык, роллердик жана суспензия ыкмасы менен жүргүзүлгөн. Вирустун биологиялык активдүүлүгү клетка культурасында (BHK-21) жана жаңы туулган чычкандарда титрлөө жолу менен аныкталган. Вирустун титри TCD50/см3 кыртыштын цитопатиялык дозаларында жана MLD50/cm3 чычкандарды өлтүрүүчү дозаларда чагылдырылган Рид жана Менч методу менен эсептелген. Вакцинанын зыянсыздыгын аныктоонун ыкмасы жаныбарларга 10 эселенген

дозаны берүүдөн турган. Мал аман калып, оорунун белгилери жок болсо, вакцина зыянсыз деп эсептелген. Вакцинанын иммуногендүүлүгү анын вирусту нейтралдаштыруучу антителолордун өндүрүшүн индукциялоо жана кутурма вирусунун "CVS" штамы менен күрөшүүдө жаныбарларды коргоо жөндөмдүүлүгү менен бааланган.

*Кан сывороткасындагы нейтралдаштыруучу антителолордун титрлерин аныктоо ыкмасы.* Ал CVS штаммынын (30-300 MLD50) вирусунун туруктуу дозасын сыноочу сыворотканын суюлтууларынын жардамы аркылуу нейтралдаштырууга негизделген. Сары суу эки эселенген эритмелер бирдей көлөмдөгү CVS вирусу менен аралаштырылды. Алынган аралашма 37°C температурада 1,5 саатка инкубацияланган жана чычкандарга булчуңуна сайылган. Нейтралдаштыруучу антителолордун титрлери Рид жана Менч методу боюнча эсептелген.

*Эмдөөдөн кийин үй жана жапайы жаныбарлардын гематологиялык жана биохимиялык кан анализдери жүргүзүлгөн*

Coulter T-540 эсептегичти (Coulter Electronics, Hialeah, FL, АКШ) жана ADVIA 120 Hematology System (Bayer Healthcare LLC, Тарритаун, NY, АКШ) автоматтык кан анализаторун колдонуу менен. Төмөнкү көрсөткүчтөр аныкталды: гемоглобиндин концентрациясы, гематокрит, эритроциттер, лейкоциттер, тромбоциттер, сегменттелген нейтрофилдер, эозинофилдер, лимфоциттер жана моноциттер. Сарысуу үлгүлөрүнүн биохимиялык изилдөөлөрү VITALAB SELECTRA 2 (Мерк, Германия) автоматтык анализаторунда DIASYS Diagnostic Systems GmbH (Германия) коммерциялык комплекттерин колдонуу менен жүргүзүлдү; төмөнкү көрсөткүчтөр аныкталды: жалпы белок, жалпы билирубин, альбумин, глюкоза, холестерин, креатинин, аспартатаминотрансфераза жана аланинаминотрансфераза.

Жаныбарларга оору жугузуу үчүн биз мээнин кесиндисинен алынган тундурмасын жана вирустун суспензияларын колдондук. Чычкандардын нерв клеткаларына сайылып жуктурулган. Натыйжаларды баалоодо оорулуу чычкандардагы клиникалык белгилердин көрүнүшү эске алынган.

*Изилдөөлөрдүн натыйжаларын статистикалык иштетүү.* Изилдөөнүн натыйжаларын статистикалык талдоо Microsoft Excel жана GraphPad Prism 8.0.1.244 колдонуу менен жүргүзүлдү.

## ӨЗДҮК ИЗИЛДӨӨЛӨРДҮН ЖЫЙЫНТЫГЫ

**3-главада "Өздүк изилдөөлөрдүн натыйжалары жана аларды талкуулоо"** эксперименттер үчүн ар түрдүү азыктандыруучу чөйрөлөрдү даярдоонун натыйжалары көрсөтүлөт. Клеткаларды жана кутурма вирусун

өстүрүү үчүн ар кандай синтетикалык азык чөйрөлөрү даярдалган. Азык чөйрөлөрүнүн курамы чөйрөнү өстүрүү үчүн түзүлгөн клеткалардын түрүнө, чөйрөнүн функционалдык максатына жана аны түзүүчүнүн жасалма шарттарда өстүрүлгөн клеткалардын муктаждыктары жөнүндөгү ойлоруна жараша өзгөрүп турган. Даярдалган азык чөйрөлөр стационардык шарттарда клеткаларды өстүрүү жана суспензия шарттарында клетка культураларын өндүрүү боюнча илимий иштер үчүн пайдаланылды.

**3.1. Клетка культураларын суспензияда өстүрүү.** Паспорттук мүнөздөмөлөргө ылайык, ВНК-21 клетка культурасы стационардык шарттарда өстүрүлөт. Стационардык өстүрүүдө инокуляциянын концентрациясы 150 ± 10 миң клетка/мл. Клетканын бир катмары 2-4-күнүндө пайда болот. БКМИИде бул клетка чөйрөсү 10% бодо малдын сары суусу менен толукталган ПСП чөйрөсүндө өстүрүүгө ылайыкташтырылган.

Клетка линияларын суспензия шарттарына ыңгайлаштыруу БКМИИ клетка банкында жеткиликтүү ВНК-21 Swedish жана ВНК-21/c13 төмөнкү клетка линияларын колдонуу менен, Techne фирмасынын биологиялык аралаштыргычтарын жана BIOTRON LIFLUS SP/SL 30 биореакторун колдонуу менен ишке ашырылган. Techne биологиялык аралаштыргычтарда культивациялоодо клеткалардын инокулярдык концентрациясы 300-350 миң/мл, ал эми "BIOTRON" LIFLUS SP/SL 30 биореакторунда изилдөө жүргүзүүдө клеткалардын концентрациясы 500 000 миң л/мл кем эмес болгон. Өсүмдүк каражаты катары биз 10% бодо малдын сывороткасы кошулган ПСС чөйрөсүн колдондук. Биологиялык Techne аралаштыргычтарда өстүрүүдө өсүү касиетине жана клетка чөйрөсүнүн түрүнө жараша өсүү чөйрөсү күн сайын же ар 2 күндө жалпы көлөмдүн 20%га чейинки өлчөмдө кошулуп турат. Биореактордо культивациялоодо клеткалардын санынын көбөйүшүнө жана pH көрсөткүчтөрүнө жараша керектүү көлөмдө жаңы өсүү чөйрөсү да кошулган, мында клеткалардын санынын суюлтуусу 500000 миң л/ден кем эмес деңгээлге чейин көзөмөлдөнгөн. мл. ВНК-21 клетка линиясынын өсүү касиеттеринин натыйжалары 1-таблицада келтирилген.

1-таблица – суспензия өстүрүүдө ВНК-21 клетка культурасынын күнүмдүк өсүшү (n=3)

| Колдонулган аппарат | Өсүү чөйрөсү | Клетка культурасы | Клетка өстүрүү чөйрөнүн концентрациясы, миң/мл | Клетка саны , сут миң/мл (X±m) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Биологиялык чалгыч Techne | ПСС | ВНК-21 швед | 320±1 | 470±4 | 531±8 | 502±5 | 350±5 |
| | | ВНК-21/с13 | 333±2 | 490±5 | 552±6 | 530±8 | 390±6 |
| Биореактор LIFLUS SP/SL 30 | ПСС | ВНК-21 швед | 507±5 | 830±4 | 1120±9 | 1030±7 | 920±8 |
| | | ВНК-21/с13 | 512±7 | 844±8 | 1417± 4 | 1525± 6 | 1100±12 |

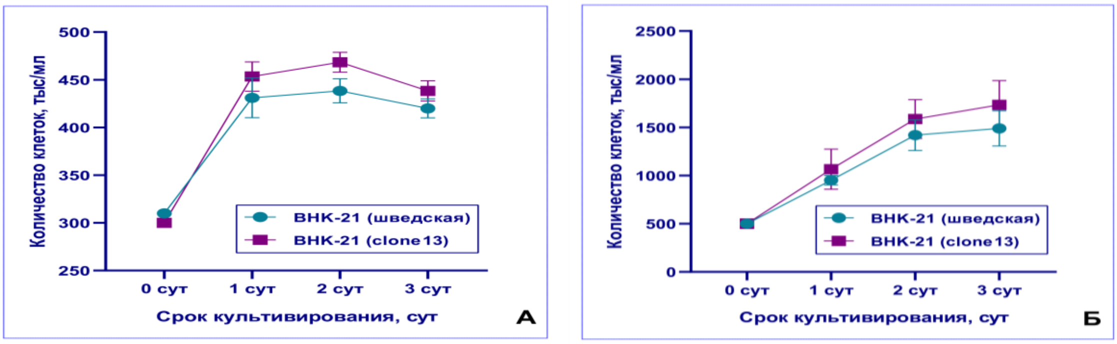
Эксперименттердин биологиялык аралаштыргычта ПСС чөйрөсүн колдонуу менен ВНК-21 Swedish жана ВНК-21/с13 клетка культураларында 3 күндүн ичинде клеткалардын санын дээрлик эки эсеге көбөйтүүгө мүмкүн экендигин көрсөттү. Андан ары өстүрүү менен тирүү клеткалардын санынын азайышы байкалат. Мында клеткаларды биореактордо окшош өстүрүүчү чөйрөдө өстүрүү 3 күндүн ичинде клеткалардын үч эсе көбөйүп жетишүүгө мүмкүндүк берет, 4 күндө тирүү клеткалардын санынын бир аз азайышы байкалат.

Изилдөөлөрдүн негизинде Techne биологиялык аралаштыргычтар алгачкы 2 күндө клетканын өсүшү үчүн гана ылайыктуу деген жыйынтыкка келүүгө болот. Биореакторду сынап көрүү учурунда клетканын өсүшүнүн активдүү фазасы алгачкы 3 күндүн ичинде байкалат, андан ары өстүрүү менен клетканын акырындык менен өлүшү байкалат. Биореактордо ВНК-21 клетка культураларын өстүрүү методун иштеп чыгуу боюнча эксперименттер клетканын андан ары өсүшүнө жетишүү үчүн кошулган жаңы азыктандыруучу чөйрөнүн көлөмүн тынымсыз көбөйтүү зарыл экендигин көрсөттү. Ошентип, иштин натыйжалары эки текшерилген клетка линиялары суспензия шарттарында культивациялоого ылайыктуу экендигин көрсөттү.

**3.2. Суспензия культивациясы, клеткалардын өсүү касиеттери боюнча себүү концентрациясынын мааниси.**

Иштин кийинки этабы суспензияны өстүрүү учурунда клеткалардын инокуляция концентрациясынын пролиферативдик касиеттерге тийгизген таасирин аныктоо болду. Бул үчүн стационардык шарттарда өстүрүлгөн ВНК-21 Swedish жана ВНК-21/с13 клетка культуралары дисперстик эритме менен алынып салынган жана клеткалар тирүү клеткалардын санын аныктоо үчүн саналган. Андан ары клеткалардын белгилүү саны менен культура суспензиясы 10% бодо малдын сывороткасын камтыган ПСС өстүрүүчү чөйрө менен жана 1 г/л концентрациядагы глютамин менен керектүү концентрация алынганга чейин суюлтулган. Алынган клеткалык суспензия концентраттары суспензия өстүрүү үчүн биологиялык аралаштыргычтарга киргизилген. Клетканы культивациялоо (37,0±0,5)°С температурада, суспензияны 60-80 айн/мин ылдамдыкта дайыма аралаштыруу менен

жүргүзүлдү. Клетканын өсүү деңгээлин аныктоо үчүн күн сайын үлгүлөр алынды. Эксперименталдык натыйжалар 1-сүрөттө көрсөтүлгөн.




1- сүрөттө ВНК-21 клетка культурасынын инокуляция концентрациясынын суспензияны өстүрүүдө өсүү темпине тийгизген таасири.

*Эскертүү:* А - кеминде 300 миң клетка/мл үрөн концентрациясы бар клетка культуралары;

В - кеминде 500 миң / мл үрөн концентрациясы менен клетка чөйрөсү. Эки клетка культурасы 10% бодо малдын сывороткасын камтыган ПСС азык чөйрөсүндө өстүрүлгөн.

Эксперименттик натыйжалар төмөндөгүлөрдү көрсөттү: клетканын концентрациясы ~ 300 миң клетка/мл болгон ПСС өсүү чөйрөсүндө суспензия өстүрүү учурунда текшерилген клетка культуралары культивация учурунда клеткалардын бир аз көбөйүшүн берет. Ошол эле учурда клеткалардын санынын концентрациясынын ~ 500 миң клетка/млге чейин көбөйүшү менен клеткалардын орточо 2-3 эсеге олуттуу өсүшү байкалат.

**3.3. Өсүү чөйрөсүн өзгөртпөстөн, убактылуу клетка өстүрүү**

Жумушта биз ВНК-21/с13 инокуляцияланган суспензия клетка линиясын колдондук. Клеткаларды өстүрүү Techne биологиялык аралаштыргычтары менен~500 миң клетка/мл үрөн клеткасынын концентрациясында жүргүзүлгөн. Өсүү үчүн 1 г/л концентрацияда 10% бодо малдын сывороткасы жана глютамин кошулган ПСС азык чөйрөсү колдонулган. Тажрыйбалар азыктандыруу чөйрөнү алмаштырбастан жана кайра толтурбастан жүргүзүлдү. Эксперименттик натыйжалар 2-таблицада келтирилген.

2-таблица – ВНК-21/с13 клеткаларын өстүрүүчү чөйрөнү өзгөртпөстөн суспензия шарттарында өстүрүү (n = 3)

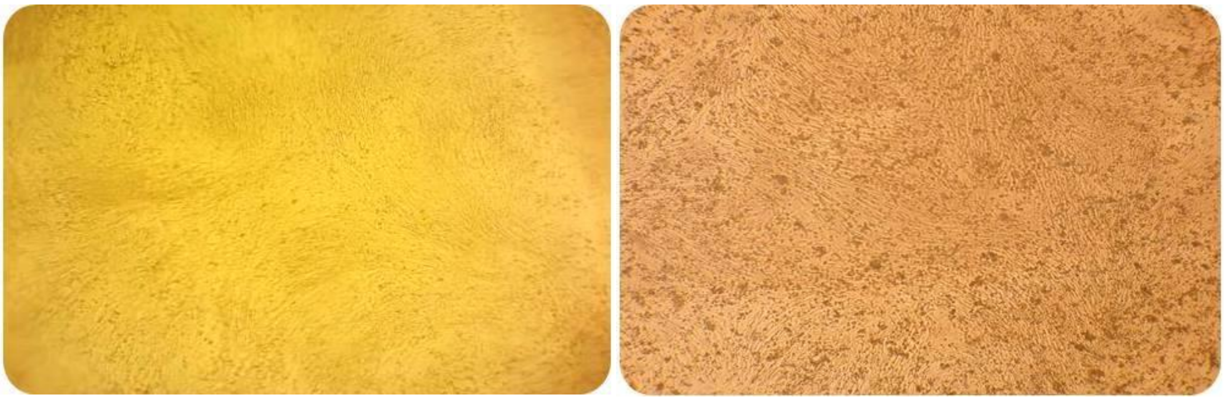
| Колдонулган аппарат | Себүүчү концентрация, миң клетка/мл | Клетканын саны миң/мл,сут | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Биологиялык | ~500±0,10 | 530±1 | 812±5 | 1024±20 | 1470±12 | 990±10 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| аралаштыргыч Techne | | 660±0,9 | 890±1 | 1108±10 | 1681±15 | 1006±6 |
| | | 590±20 | 877±10 | 1070±8 | 1668±10 | 1012±8 |

Изилдөөнүн натыйжалары көрсөткөндөй, 4 күндүн ичинде (байкоо мезгили) клеткалардын санынын көбөйүшү байкалат, андан кийин топтоо динамикасы активдүү азаят. Балким, бул клеткалардын жашоо активдүүлүгүнө байланыштуу, б.а. зат алмашуу продуктуларынын ашыкча топтолушуна байланыштуу, клеткалардын кескин өлүмүнө алып келген клеткаларга терс таасири бар. Ошентип, суспензия шарттарында культивациялоо үчүн азыктандыруучу чөйрөнү өзгөртүү менен культивациялоо ыкмасын колдонуу сунушталат, анткени бул клетканын массасын үзгүлтүксүз топтоо мүмкүнчүлүгүн берет.

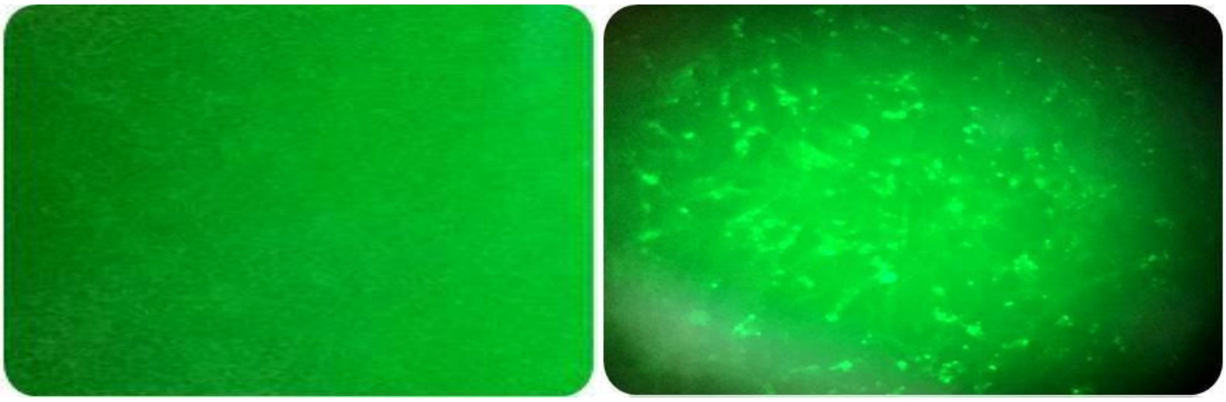
### 3.4. Кутурма вирусунун "VRC-RZ2" штаммынын жаңылануусу.

Кутурма вирусун жаңылоо үчүн “Вирус культивациялоо технологиясы” лабораториясында сакталган VRC-RZ2 штаммынын кутурмага каршы вирусту камтыган культура суспензиясынын алты үлгүсү алынды. Бул үлгүлөр BNK-21/c13 клетка маданиятында пассаж ыкмасы менен жаңыртылган жана андан аркы иш үчүн бир үлгү алынган. Кутурма вирусунун бар экендиги электрондук микроскопиянын натыйжалары менен жана ELISA реакциясында тастыкталган. Кийинчерээк, вирус BHK-21 / c13 клетка культурасы менен эмделген 48 көзөнөктүү плиталарда жана слайд камераларында көрсөтүлгөн. Биринчи учурда натыйжа вирустун цитопатиялык таасири менен аныкталса, экинчисинде МФА реакциясында вирустун көрсөткүчү аныкталган. Эксперименттин натыйжалары 2 жана 3-сүрөттөрдө көрсөтүлгөн.



А Б

(А - контролдоочу клетка культурасы, В -инфекцияланган клеткакультурасы)
2-сүрөттө BHK-21/c13 клетка культурасында кутурма вирусунун цитопатиялык аракети.



А Б

(А - контролдоочу клетка культурасы, В -инфекцияланган клетка культурасы)

3-сүрөт. Вирустун көрсөткүчү МФАга алып келет.

2-сүрөттөн көрүнүп тургандай жаңыланган вирус жуккан клеткаларга мүнөздүү цитопатиялык таасир көрсөтөт, ал эми контролдук кудуктарда эч кандай өзгөрүү байкалган эмес. МФА реакциясын койгондо (3-сүрөт) оозеки кутурма вирусунун бар экендигин көрсөткөн спецификалык изумруд жарыгы чагылышып байкалып турат. Пайда болгон матрицалык вирустун биологиялык активдүүлүгү 0,03 мл көлөмдө вирус менен нерв клеткаларына инъекцияланган, ар бир топко 4 ак чычкандарга титрлөө жолу менен колдонулду(таблица 3).

Таблица 3 - "VRC-RZ2" штаммынын биологиялык активдүүлүгүн аныктоо

| Жаныбарлардын группасы | Вирустун өсүүсү | Жыгылуусу | Тирүү калганы |
|---|---|---|---|
| 1 | $10^{-2}$ | 4 | 0 |
| 2 | $10^{-3}$ | 4 | 0 |
| 3 | $10^{-4}$ | 2 | 2 |
| 4 | $10^{-5}$ | 2 | 2 |
| 5 | $10^{-6}$ | 0 | 4 |

Оору учурунда өлгөн чычкандардын бардыгында кутурма оорусунун мүнөздүү клиникалык көрүнүштөрү байкалган. 3-таблицада келтирилген маалыматтардан вирустун биологиялык активдүүлүгү 6,0 lg MLD50 / 0,03 болгондугу көрүнүп турат. Бактериялык чөйрөлөргө себүүдө матрицалык материал стерилдүү экендиги аныкталган, ошондуктан ал лиофилизацияланган, сертификацияланган жана КР ӨКМнин КН БКМИИ

РМКнын «Микроорганизмдердин коллекциялары» лабораториясына сактоого өткөрүлүп берилген.

**3.5. Кутурма вирусун көбөйтүү үчүн оптималдуу клетка маданиятын тандоо.**

Эксперименттердин кийинки сериясында биз көбөйүүнүн жогорку темптери менен культуралык суспензияларды алууга мүмкүндүк бере турган сезгич клетка линиясын тандап алышыбыз керек болчу. «VRC-RZ2» штамын өстүрүү үчүн колдонулат: ПЯ, ПЩ жана үзгүлтүксүз клетка культуралары: ВНК-21/с13, ПС, Vero жана МДВК, пробиркаларда стационардык түрдө өстүрүлгөн биринчи-трипсиндүү клетка культурасы. Бул үчүн клетка культураларына кутурма вирусу жуккан жана ЦПД пайда болгонго чейин (37 ±1)°С температурада өстүрүлгөн. Алынган вакцинацияланган суспензиялардын биологиялык активдүүлүгү ПС клетка культурасында титрлөө жолу менен аныкталган.

Жүргүзүлгөн иштердин натыйжасында текшерилген клетка линияларынын ичинен ПСжана ВНК-21 клетка культуралары кутурма вирусуна сезгичтиги аныкталган.

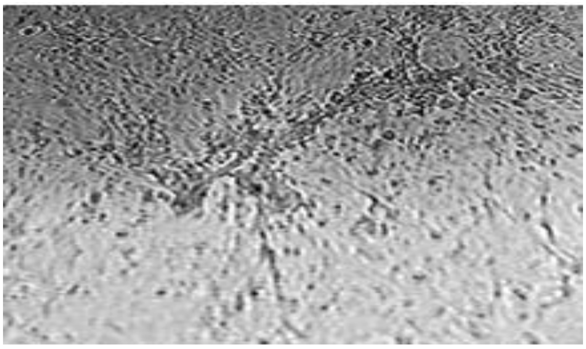
ПС клетка культурасында ЦПД культивациянын 3-күнүндө тегеректелген жарыкты сындыруучу клеткалар түрүндө байкалган, алардан жиптер чыккан майда конгломераттар пайда болгон. Андан ары культивациялоодо очоктордун саны жана алардын өлчөмдөрү көбөйдү, 5-6-күндө жабыркаган клеткалар ажырап, катмар бир аз сейрек кездешет жана тегерек формадагы көп сандагы жеке жарыкты сындыруучу клеткалардын пайда болушу байкалган. Вирусту титрлөөдө ПС клетка культурасындагы 1-5-деңгээлде вирус тундурмасына жараша 4,50 ± 0,08 lg TCD50 / мл, 5,75 ± 0,25 lg TCD50 / мл болгон. ВНК-21 клетка культурасындагы ЦПД да культивациянын 3-күнүндө байкалган, бирок ал азыраак болгон. Клеткалардын тегеректелгени, бир аз фрагментация байкалган, ал культивация мезгилинин көбөйүшү менен жабыркаган клеткалардын агрегацияланышы менен алмашылып, андан кийин айнектен клетка агрегаттарынын бөлүнүшү байкалган. ВНК-21 клеткаларынын культурасынан алынган суспензиялардагы вирустун титри 4,75-6,00 lg TCD50/мл болгон. Клетка культураларында ПС, ВНК-21/с13, ВБ антигени МФА аркылуу аныкталган. ПС, ВНК-21/с13 клетка линияларында алынган вакцинацияланган суспензиялардан алынган үлгүлөрдү электрондук микроскоп менен изилдөө ВБ вириондорунун бар экендигин көрсөттү (4-сүрөт).

4-сүрөт Инфекцияланган BHK-21/c13 клетка культурасынан кутурма вирусунун вириондорунун электрондук микроскопиясы чоңойтулду 200000.
Сүрөт улук илимий кызматкердин уруксаты менен алынды Н.С. Кожабергенов

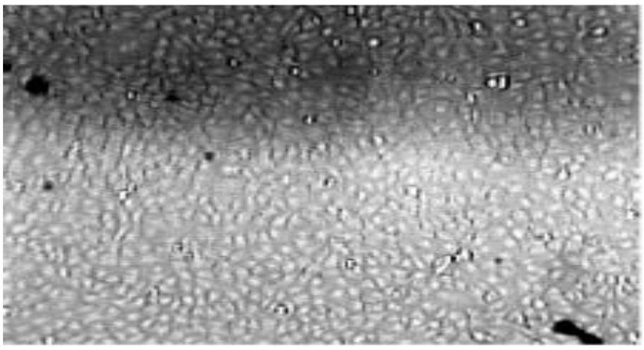
Калган сыналган клетка культураларында 3 жолу катары менен өтүү учурунда ВБнын цитопатиялык активдүүлүгүнүн көрүнүшү аныкталган эмес. Электрондук микроскоп менен изилдөөдө ар кандай өткөөлдөрдүн культуралык суспензиялары да аныкталган эмес, ал эми вирустук антиген МФА тарабынан аныкталган эмес.

Белгилей кетсек, 6-10-күндө BHK-21/c13 клетка культурасында ВБ титрлөө инфекцияланган да, контролдоочу клетка культураларында да спецификалык эмес дегенерациянын пайда болушуна алып келген, сыягы, бул культура клеткаларынын картаюусу менен байланыштуу линиясы колдонулат. Баяндалган жагдайлар жыйынтыктарды окууда кыйынчылыктарды жаратты. Ошондуктан, ВБнын инфекциялык активдүүлүгүн аныктоо үчүн тесттик система катары окшош кемчиликтери жок ПС клетка культурасы тандалган. ПС клетка маданиятында ВБ цитопатиялык таасири жана инфекцияланбаган клетка культураларында окшош өзгөрүүлөрдүн жоктугу сүрөттө

көрсөтүлгөн. 5 (а, б).



а - ПС клетка культурасында ЦПД кутурма вирусу я



б - Контролдук, инфекцияланбаган ПС клетка мадани

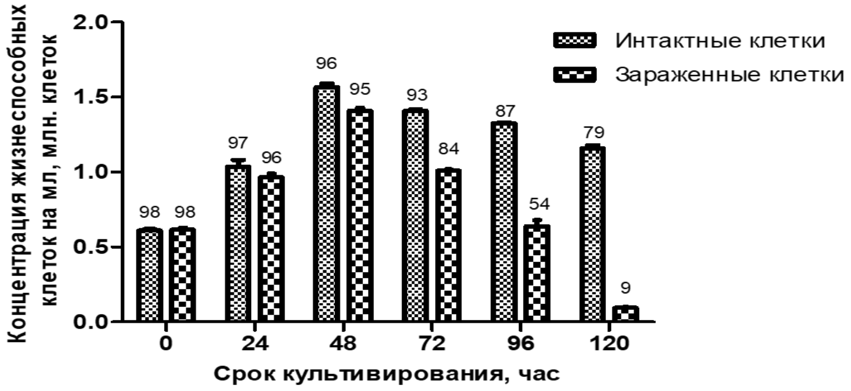
5-сүрөт. ВБ-нын цитопатиялык эффектиси жана инфекцияланбаган ПС клетка культураларында окшош өзгөрүүлөрдүн жоктугу.

Өзгөчө клетка культурасынын линияларын тандоо боюнча жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжасында ПС жана ВНК-21/с13 клетка культуралары ВБ үчүн оптималдуу экени аныкталган.

**3.6. Суспензия культивациясында кутурма вирусун өстүрүүнүн оптималдуу мөөнөтүн аныктоо.**

Эксперименттерде биз ВНК-21/с13 клеткаларынын үзгүлтүксүз культурасын, L-глютамин 0,6 г/л кошулган ПСС азык чөйрөсүн, бодо малдын 2% сары суусун, кутурма вирусунун "VRC-RZ2" штамын колдондук (5-параграфта ВНК-21 / с13, титр 7,25 lg MLD50 / мл).

Эксперименттердин жүрүшүндө кутурма вирусунун "VRC-RZ2" штаммы менен жабыркаган колдонулган клетка линиясынын пролиферативдик касиеттери, ошондой эле инфекцияланбаган ВНК-21/с13 клеткаларынын линиясы аныкталган. Изилдөө натыйжалары 6-сүрөттө берилген.



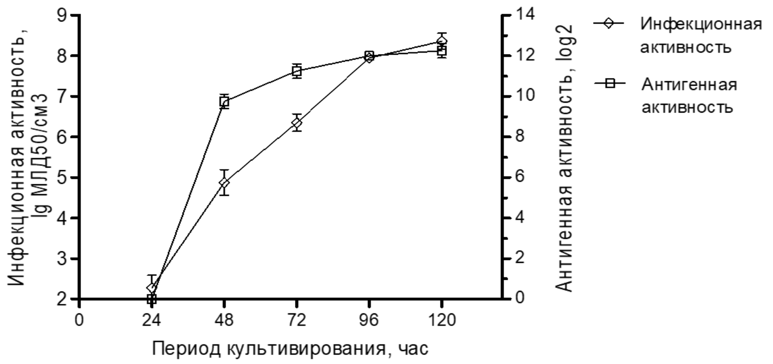

Мамычалардын жогорку бөлүгү суспензиядагы клеткалардын жалпы санынан жашоого жөндөмдүү клеткалардын пайызын көрсөтөт.

6-сүрөт. Инфекцияланган жана бузулбаган ВНК-21/с13 клеткаларын суспензия ыкмасы менен өстүрүү.

6-сүрөттөгү маалыматтардан көрүнүп тургандай, инфекциядан 24-48 саат өткөндөн кийин клеткалардын эң жогорку пролиферативдик активдүүлүгү байкалган. Инфекцияланган жана бузулбаган ВНК-21/с13 культурасындагы жашоого жөндөмдүү клеткалардын концентрациясы 1 мл үчүн 1,45 жана 1,5 миллион клетканы түздү. Бул мезгилде пролиферация индекси 2,5ти түздү. Кийинки өстүрүү учурунда суспензиядагы жашоого жөндөмдүү клеткалардын санынын азайышы жана өлгөн клеткалардын үлүшүнүн параллелдүү өсүшү белгиленди. 72-96 сааттан кийин инфекцияланган клеткаларда жашоого жөндөмдүү клеткалардын пайызы 54-84% түздү. Өлгөн клеткалардын 90% деңгээлине жеткенде, өстүрүү токтотулган. Көрсөтүлгөн деңгээлге культивациянын 5-күнүндө инфекция

жуккан клетка культурасы үчүн жеткен, ал эми бүтүн клетка культурасы үчүн 8 күн болгон.

Инфекциядан кийин 24-120 сааттан кийин алынган вирустук суспензиялардын үлгүлөрүнүн инфекциялык жана антигендик активдүүлүгүн изилдөөнүн натыйжалары 7-сүрөттө көрсөтүлгөн.




7-сүрөт – культивация мезгилине жараша вирустук суспензиялардын инфекциялык жана антигендик активдүүлүгү

7-сүрөттө көрсөтүлгөн маалыматтар вирусту өстүрүүдөн 24-120 саат өткөндөн кийин суспензия клеткасынын культурасында вирустун көбөйүү белгилеринин бар экендигин көрсөтүп турат. Вирустук суспензия үлгүлөрүнүн 48-72 сааттан кийин антигендик жана инфекциялык активдүүлүгү тиешелүүлүгүнө жараша 10-11 log2 жана 4,75-6,25 lg МЛД 50/мл болгон. 96-120 сааттан кийин алынган суспензия үлгүлөрүндө биологиялык активдүүлүктүн эң жогорку көрсөткүчтөрү белгиленген. Корреляциялык талдоо вирустук суспензиялардын үлгүлөрүндө инфекциялык жана антигендик активдүүлүктүн ортосундагы көз карандылыктын жогорку даражасын (r = 0,97) аныктагандыгын белгилей кетүү керек.

72-96 сааттан кийин катталып, клетканын жашоо жөндөмдүүлүгүнүн төмөндөшү жана инфекцияланган ВНК-21 культурасынын пролиферативдик активдүүлүгүнүн жоктугун, ошондой эле клетка суспензиясында инфекциялык жана антигендик активдүүлүктүн максималдуу топтолушун эске алуу менен 96-120 саат, кутурма вирусун өстүрүүнүн оптималдуу мөөнөтү 96 саат деп жыйынтык чыгаруу керек.

### 3.7. Ири культивацияда вирустун кайталанышы

### Кутурма вирусунун суспензиясын өстүрүү

Биринчи этапта суспензиядагы клеткалардын максималдуу концентрациясын камсыз кылган ВНК-21/с13 клетка линиясын суспензия

өстүрүү үчүн оптималдуу азык чөйрөсүн тандоо зарыл болгон. Бул максатта ПСС жана GMEM (1:10 пропорциясында триптоза-фосфат сорпосу кошулган) азык чөйрөсүн колдондук. Культивация 175 мл спиннерлерде Techne магниттик аралаштыргычтарында 40 айн/мин ылдамдыкта жүргүзүлдү. Культивациялоодо натрий гидрокарбонатын кошуу менен pH 7,2-7,4 чегинде сакталган. Изилдөөнүн натыйжалары 4-таблицада келтирилген.

4-таблица BHK-21/c13 клетка линиясын өстүрүү үчүн оптималдуу азык чөйрөсүн тандоо.

| Азык чөйрөсү | Культивациялоо убагы, саат | Клетка концентрациясы (кл/мл) | % Тирүү клеткалар |
|---|---|---|---|
| ПСС | 96 | $1,35x10^{6}$ | 96 % |
| GMEM | 96 | $7.64x10^{5}$ | 100 % |

Алынган маалыматтар (4-таблица) ПСС азык чөйрөсүн колдонууда 96 саат өстүрүүдөн кийин клеткалардын концентрациясы GMEM чөйрөсүн колдонууга караганда дээрлик 2 эсе жогору экендигин көрсөтүп турат. Маанилүү фактор - бул акыркы чөйрөнүн жогорку баасы.

Ошентип, ПСС азык чөйрөсүн колдонуу менен BHK-21/c13 клеткаларын суспензия ыкмасы менен өстүрүү боюнча андан аркы эксперименттер алгач ар кандай көлөмдөгү (175, 350, 700 мл) спиннерлерде жүргүзүлдү, алардын суспензиясы ырааттуу түрдө кичинеден өткөрүлүп берилди көлөмдүү спиннерлерди чоңураактарына.

Клеткаларды эсептөө жана pH контролдоо үчүн күн сайын спиннерлерден үлгүлөр алынды. Көлөмү 700 мл болгон төрт спиннердин мазмуну жалпы идишке бириктирилип, БИОТРОН биореакторунда клеткаларды суспензия өстүрүү үчүн колдонулган. Төмөнкү параметрлер менен культивациялоо: аш болумдуу чөйрөнүн температурасы (37 ± 05) оС, pH - 7,2-

Клеткаларды 120 саат бою 1,2х106 клетка/мл клетка концентрациясында өстүргөндөн кийин, өндүрүштүк ВБ биореакторго киргизилип, тирүү жана өлгөн клеткаларды күн сайын эсептөө менен 72 саатка инкубацияланды. Натыйжада 7,8 литр көлөмдөгү ВБ вакцинацияланган суспензиясы иштелип чыгып, матрацтарга куюлуп, минус 20°С температурада сакталган.

**Жапайы жаныбарларды эмдөө үчүн ылайыктуу вакцина даярдоо формаларын иштеп чыгуу боюнча изилдөөлөр**

Полимерлердин жардамы менен жемдерди даярдоо үчүн 30% желатин эритмеси (Сигма - Олдрих, Сент-Луис, МО, АКШ) же дистирленген суудагы 20% агар эритмеси даярдалып, полимер шишип кетүүсү үчүн түнү бою (18 саат) сакталган. Тоок эмбриондору («Аллел-Агро» Канаттуулар фабрикасы, Казакстан) гомогенизатордо майдаланган, эт жана сөөк уну кошулган. Полимердик эритме 20 мүнөт бою 60 ° С чейин ысытылган, андан кийин 37 ° С чейин муздатылган жана тооктун эмбриондору, эт жана сөөк уну жана уйдун даамын (уйдун этинин маңызы) камтыган стаканга киргизилген, 3000 айн / мүнөттө 10 мүнөт гомогендештирилген. Алынган аралашма вакцинаны камтыган ыйлаакчасы бар атайын калыпка (8-сүрөт) куюлуп, андан кийин 4°С 1 саатка муздатылган.

8-сүрөт. Полимерлерди колдонуу менен даярдалган жемдин формасы.

Алынган вакцина-брикетинин салмагы 25-30 г өзгөчө жыты бар ачык күрөңдөн кара күрөңгө чейин түскө ээ. Жем 106,75 TCID50 дозасында суюк формада вирусту камтыйт. Даяр жем-брикет капталдары 5×3×2 см болгон көңдөй тик бурчтуу параллелепипедтин формасына ээ. Жем-брикетинде вакцинанын бир дозасы бар. Жемдердин ар кандай формалары жана курамы жаныбарларга жагымдуулугун текшерүү үчүн сыналган. Жапайы жаныбарлардын модели катары 3 айлык жана андан жогорку жаштагы жолбун иттер колдонулган. Жаныбарлар 1 сутка тамаксыз виварийде кармалып турду. Жаныбарларды 5 баш жаныбар бир виварий бөлмөсүндө багылган. Жемдер ар бир жемдин 10 үлгүсүнө салынып, жаныбарлардын жемдин ар кандай түрлөрүн жегенге болгон артыкчылыктары жазылган. Изилдөөлөрдүн натыйжалары 5-таблицада келтирилген.

5-таблица. Жем брикеттерин иттер жегенге жөндөмдүүлүгү

| Жемдин формасы жана | 1 группадагы жаныбарлар | 2 группадагы жаныбарлар |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| курамы | | |
| Брикеттер (эт-сөөк уну, тоок эмбрионы, желатин) | 90% | 80% |
| Брикеттер (ун- сөөк уну, тоок эмбрионы, уй эти үчүн ароматизатор, желатин) | 100% | 100% |

5-таблицадагы маалыматтарды эске алуу менен, жаныбарлар брикет жана цилиндр түрүндө даярдалган, эт жана сөөк унун, тооктун эмбриондорун, уйдун даамын жана желатинди камтыган модификацияланган жемди эң көп артык көрүшкөн деген тыянак чыгаруу керек.

Изилдөөлөрдүн натыйжалары жемдин өзгөртүлгөн курамы жырткычтар үчүн эң жагымдуу экенин көрсөттү.

Ошентип, Жамбыл облусунун аймагында колдонууга ылайыктуу, жегенге жарамдуулугу 100% болгон жем иштелип чыккан.

Изилдөөбүздүн жыйынтыгында эт жана сөөк уну, тоок эмбриондору, уйдун даамдаткычы, желатин камтылган жемдердин сериясын даярдадык. Бул жем жапайы жаныбарлардын табигый чөйрөсүндө сыналган. Бул изилдөөлөрдүн натыйжалары 9-сүрөттө көрсөтүлгөн.

А – N43°28´32.5" E 075°08´00.3" 754 м  Б – N43°28´41.7" E 075°07´54.1" 759 м

9-сүрөт. Талаада жемди сынап көрүү (түндө камера, капкан менен тартуу - Moultrie® M990i)

**Жолбун иттерге жана жапайы жырткычтарга каршы вакцинанын эффективдүүлүгү.**

Изилдөөгө 3-12 айлык 46 жолбун ит, 8 карсак талаа түлкүсү (Vulpes corsac) жана 8 талаа карышкыры (Canis lupus campestris) пайдаланылды. Эмдөө алдында жаныбарлар туш келди үч топко бөлүнгөн: (1) вакцинанын коопсуздугу боюнча тест тобу (N = 12), (2) натыйжалуулук тобу (N = 30) жана (3) контролдук топ (N = 20) (таблица 20). Карантинден кийин жаныбарлар 1 күн тамаксыз кармалып, андан кийин вакцина препараты

менен ыйлаакчасы бар брикет-жем менен азыктандыруу жолу менен эмделген. Ооз аркылуу берилүүчү вакцинанын коопсуздугун изилдөө үчүн жаныбарларга (ит 6, 3 карсак жана 3 карышкыр) ар бир малга вакцинанын 10 эселенген дозасы берилген. Малга 20 күн бою күн сайын байкоо жүргүзүлдү. Вакцина брикетине азыктангандан кийин 5 жана 10-күндө жаныбарлардан шилекей жана кандын үлгүлөрү кутурма вирусунун изоляциясын аныктоо үчүн алынган.

Ооз аркылуу берилүүчү вакцинанын эффективдүүлүгүн изилдөө үчүн жаныбарларга (24 ит, 3 карсак жана 3 карышкыр) ар бир малга вакцинанын бир дозасы (жем) берилген (10-сүрөт). Нейтралдаштыруучу антителолордун (ВНА) кутурма вирусуна карата иммундук жоопторун аныктоо үчүн кандын сары суусу (Бектон Дикинсон вакутайнеринин бир түтүкчөсүнө 10 мл), 14(N=30 мал/топ), 30 (N = 27 жаныбар/топ) кийин алынган, 60(N = 24 жаныбарлар / топ), 90 (N = 21 жаныбарлар / топ), 120 (N = 19 жаныбарлар / топ), 150 (N = 17 жаныбарлар / топ), 180 (N = 14 жаныбарлар / топ) жана эмдөөдөн кийин 210 (n = 11 жаныбар / топ) күндөн кийин нейтралдаштыруу реакциясында (РН) изилденген.

10-сүрөт. Жем -брикеттерин вакцина менен азыктандыруу

Жолбун иттердин кутурма вирустук инфекциясына каршы коргоочу иммундук жооптун узактыгын аныктоо үчүн эмдөөдөн кийин 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180 жана 210 күн өткөндөн кийин үч эмделген жана эмделбеген эки итке CVS вирустук штаммдары сайылган. Вируленттүү штамм катары кутурма вирусу "CVS" 1000 MLD50/мл вирустун эсептелген дозасы колдонулган. Контролдук изилдөө иттерде гана жүргүзүлгөн.

Таблица 6 - Жаныбарлар жана изилдөө топтору

| Топтор | Жолбун иттер | Корсак | Карышкырлар | Баары |
|---|---|---|---|---|
| Коопсуздук тобу | 6 | 3 | 3 | 12 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Эффективдүүлүк тобу | 24 | 3 | 3 | 30 |
| Контролдук тобу | 16 | 2 | 2 | 20 |
| Баары | 46 | 8 | 8 | 52 |

Нейтралдаштыруу реакциясынын сыноосу 8-10 г салмактагы чычкандарда жүргүзүлдү.Чычкандар ДСУ сунуштаган методду так сактоо менен 0,03 мл инкуляцияны колдонуу менен мээ ичине себилди. Аларга CVS штаммы 50 $МЛД_{50}$/0,03 мл дозада сайылган.

Иттерде $10^{6,50}$ ТЦД50 иммунизациялоочу дозада эмдөөдөн 14 күн өткөндөн кийин, ВНА деңгээли 0,59 ± 0,12 IU / мл, 30 күндөн кийин - 1,37 ± 0,48 IU / мл, вакцинациядан 90 күндөн кийин ВНА деңгээли 1,04 IU ± 0,04 болгон. / мл, ал эми 210 күндөн кийин ВНА деңгээли 0,48 ± 0,48 IU / мл болгон.

Вакцинацияланган жапайы жырткычтардын (карсактар жана карышкырлар) кандын сары суусунда ВНК деңгээлинин топтолуу динамикасы иттерге караганда төмөн, ~ 0,08-1,15 ХБ/мл. Ал эми жапайы жырткычтарда эмдөөдөн кийин 180-күнү ВНА деңгээли <0,5 IU/мл болгон (сүрөт 19В, 19С). Бул изилдөөлөрдүн алынган натыйжаларын талдоо эмдөөдөн кийин 60 жана 210 күн өткөндөн кийин үч топтун ортосунда иммунизацияланган жаныбарлардын кан сары суусундагы ВНКнын деңгээли жана динамикасы олуттуу айырмачылыкка ээ болгондугун ($P \leq 0,001$) көрсөттү.

*Инфекцияны көзөмөлдөө*. 30 күндүк интервал менен эмдөөдөн кийин эмдөөдөн өткөн жана эмделбеген жаныбарларга каршылык көрсөтүлдү, эмдөөдөн өткөн бардык иттер 180 күн бою вируленттик вирустун киришине жооп берген жок, ал эми контролдоочу топтор кутурманын мүнөздүү клиникалык көрүнүшү менен ооруп калышты. 210-күнү вируленттүү вирус менен контролдук инфекция менен эмделген 3 иттин ичинен 1 ит 14-күнү оорунун биринчи клиникалык белгилерин көрсөтө баштаган жана бул жаныбар ошол эле клиникалык белгилери менен жуккандан 24 күндөн кийин өлүп калган, оору контролдоо тобунда болуп саналат.

Бирок контролдоочу жаныбарларда (вакцинацияланбаган иттерде) оорунун биринчи клиникалык белгилери вируленттик вирус киргенден кийин 6-күнү байкалган, ал эми контролдук жаныбарлар 11-13-күнү өлүшкөн (20А-сүрөт).

Өлүмдүн өзгөчөлүгү иммунофлуоресценттик тесттин жардамы менен тастыкталган. Контролдук жаныбарлардан алынган бардык үлгүлөр ВБ үчүн оң болду. Иммунофлуоресценциянын жардамы менен гиппокамптын жана шилекей бездеринин үлгүлөрүндө эмделген иттерде ВБ аныкталган эмес.

Малды эмдөөдөн кийин 14-күнү вакцинанын бир дозасы менен эмдөө жүргүзгөндө, малдын 85%ында ВНА жетиштүү деңгээлде болгон. 30-күнүдөн баштап жана бүткүл эксперименттин жүрүшүндө вируленттүү кутурма вирусунан коргонуу үчүн зарыл болгон ВНА деңгээли эмделген жаныбарлардын 100%ында аныкталган (2б, 2в-сүрөт). Титрлер 180 күн бою туруктуу болгон; 210-күнү, ВНА титери <0,50 IU / мл чейин төмөндөгөн. Ошол эле учурда эмделген иттердин тобунда эмдөөдөн кийинки 210-күнү аман калуу 93,7%ды түздү. Буга карабастан, тесттик вакцина кутурманын алдын алуу үчүн натыйжалуу жана коопсуз дары болуп саналат.

## КОРУТУНДУ

1. VRC-RZ2 кутурма вирусунун штаммынын көбөйүшү үчүн оптималдуу клетка культурасы тандалды
2. Кутурма вирусун өстүрүүнүн оптималдуу параметрлери BHK-21/c13 клетка культурасындагы VRC-RZ2 штаммы иштелип чыккан, бул 5,75-6,00 г TCID50/мл биологиялык активдүүлүгү менен суспензия шарттарында вирустук биомассаны өндүрүүгө мүмкүндүк берет.
3. Алынган вакцинанын коопсуздугу жана иммуногендүүлүгү иммунобиологиялык препараттарга коюлган талаптарга жооп берет.
4. Кутурма вирусунун VRC-RZ2 штаммынан вируска каршы вакцина жасоонун технологиясы жакшыртылды, атап айтканда, жемдин курамы өзгөртүлүп, заманбап жагымдуу даамдар кошулду. Жемдин жагымдуулугу жогору жана эт менен азыктангандар үчүн 100% жегиликтүү жана арзан баага ээ.
5. Кутурма вирусун суспензия менен өстүрүү технологиясы кеңейтилди.
6. VRC-RZ2 модификацияланган БВ штамы жапайы жырткычтардагы кутурмага каршы вакцинага талапкер катары колдонууга ылайыктуу жана максаттуу жаныбарлар үчүн коопсуз экендиги тастыкталды. Ошол эле учурда малга вакцинанын 10 дозасын берүү организмге терс таасирин тийгизбей турганы аныкталган.
7. Describe Кеминде 5,75 lg TCD50 / мл дозадагы вакцинаны жаныбарлар бир жолу жуткандан кийин кутурма вирусуна каршы нейтралдаштыруучу антителолордун пайда болушун шарттайт (ВНА титрлери - 5,20 log2 чейин), ошондой эле CVS инфекциясынан кийин жаныбарларды оорулардан коргойт. Ошол эле учурда вирусту нейтралдаштыруучу антителолор эмдөөдөн кийин 200 күндөн кем эмес жетиштүү санда калаары аныкталган.

## ПРАКТИКАЛЫК СУНУШТАР

Кутурма вирусунун VRC-RZ2 штаммынан культураланган ооз аркылуу берилүүчү вакцинаны өндүрүүнүн өркүндөтүлгөн технологиясын биологиялык өнөр жайда жапайы жырткыч жаныбарлар үчүн коопсуз жана иммуногендик вакцинаны түзүү үчүн колдонуу сунушталууда.

Практикалык колдонуу үчүн кутурма вирусунун VRC-RZ2 штаммынан ооз аркылуу берилүүчү вакцина өндүрүү үчүн ченемдик-техникалык документтер сунушталат, ал БКМИИнин Илимий кеңеши тарабынан жактырылган, институттун директору тарабынан бекитилет жана төмөнкү документтердин:

- культураланган кутурмага каршы вакцинаны даярдоо жана контролдоо боюнча нускамалар;
- Кутурмага каршы ооз аркылуу берилүүчү вакцина үчүн уюштуруу стандарты [СТ 405-1919-04 ГП-073-2012];
- кутурмага каршы ооз аркылуу берилүүчү вакцинаны колдонуу боюнча көрсөтмө.

## ЖАРЫЯЛАНГАН ИШТЕРДИН ТИЗМЕСИ

1. **Ершебулов, З.Д.** ВНК -21 / С 13 клетка линиясын суспензия өстүрүүнүн оптималдуу параметрлерин аныктоо [Текст] / [Ж.Ж.Саметова, Л.Г. Мараховская, Ж.Т. Аманова, Е.Г. Шаяхметов жана башкалар] // Биокоопсуздук жана биотехнология. - 2021.- № 5. - С.37-41.

2. **Ершебулов, З.Д.** Кутурма вирусунун "VRC-RZ2" штамын инактивациялоо үчүн димеретилениминдин оптималдуу концентрациясын аныктоо [Текст] / Кондибаева Ж.Б., К.Д., Жугунисов, Н.К. Далбаев, Э.А. Булатов // В.И. атындагы Казак агротехникалык университетинин илим жарчысы. С.Сейфуллина (тармактар аралык), - 2019. - № 3 (102). - S. 223-231.

3. **Z.Yershebulov,** Protective immune response of oral rabies vaccine in stray dogs, corsacs and steppe wolves after a single immunization [Текст] / K. Zhugunisov, Ye.Bulatov, D.Taranov at all. // Arch.Virol. - 2017.-№162.- P.3363-3370 (IF-2,574).

4. Эршебулов, З.Д. Жапайы жана үй жырткычтардагы кутурмага каршы оозеки вакцинанын коопсуздугу [Текст] / [К.Д. Жугунисов, Е.А. Булатов, Д.С. жана башкалар] // Л.Гумилев атындагы Евразия университетинин жарчысы.-2016. - № 4 (113) - С. 40-49.

5. **Ершебулов, З.Д.** Жаныбарлардын кутурма вирусуна каршы активдештирилген вакцинасынын иммуногендик активдүүлүгүнүн өндүрүштүк сыноолору [Текст] / [К.Д. Жугунисов, Д.С. Таранов, Е.А.

Булатов, т.б.] // «КазНУ жарчысы. Биологиялык серия ".- 2016. -№4 (69) - 124-131 б.
6. **Ершебулов, З.Д.** Жапайы жырткычтардын кутурмасына каршы оозеки кутурма вакцинасын жасоо ыкмасы [Текст] / [А.Р. Сансызбай, Е.А. Булатов, Е.С. Жилин жана башкалар] // Пайдалуу модель № 101894 30.09.2015
7. **Ершебулов, З.Д.** Жаныбарлардын кутурма оорусунун алдын алуу үчүн инактивдештирилген кутурмага каршы маданий вакцинаны өндүрүү ыкмасы [Текст] / Жилин Е.С., Сансызбай А.Р., Далбаев Н.К. // Пайдалуу модель № 99704 12.08.2015, жарыяланды 2015 / 0941.1.
8. **Ершебулов, З.Д.** BHK-21 клеткаларынын суспензия культурасында кутурма вирусунун "VRC-RZ2" штамын өстүрүү мүмкүнчүлүгүн эксперименталдык изилдөө [Текст] / [Д.С. Таранов, Е.С. Жилин, З.Д. Эршебулов жана башкалар] // Жыйнак материал. II Эл аралык илимий. conf. - шаар. Гвардия.- 2014. - № 4. - Б.175-178.
9. **Ершебулов, З.Д.** Жаныбарлардын кутурмасына каршы оозеки вакцина (NIIPBB) / Закирья К.Д. // ST 405 -1919-04 GP-127-2020. NTD
10. **Ершебулов, З.Д.** Биологиялык коопсуздукту баалоо критерийлери жана методологиясы [Текст] / [Э.Н. Троицкий, Е.Н. Жилин, С.М. Мамадалиев, К.Б. Баракбаев] // Жыйнак. матер. Эл аралык илимий-практикалык Conf. «Казакстандагы биотехнология: инновациялык өнүгүүнүн көйгөйлөрү жана келечеги». - Алматы. - 2008. -С.595-598.

## РЕЗЮМЕ

диссертации Ершебулова Закира Джапаровича на тему: «Совершенствование технологии изготовления антирабической пероральной вакцины для диких плотоядных животных» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология

**Ключевые слова:** бешенство, дикие животные, вакцина, приманка, иммунитет, безопасность, культура клеток, патогенность, культивирование.

**Объект исследований:** штаммы вируса бешенства и пероральная вакцина против бешенства.

**Предмет исследования:** антирабическая вакцина

**Цель работы**: совершенствование технологии изготовления и испытание антирабической вакцины для профилактики бешенства среди диких плотоядных животных.

**Методы исследования и аппаратура:** суспензионное культивирование клеток и вируса, выявление антигена вируса методом иммунофлуоресценции, биопроба, биотехнологические методы, серологические методы.

**Полученные результаты и их новизна:** Впервые в Казахстане масштабирован метод суспензионного культивирования и отработаны

оптимальные параметры суспензионного культивирования штамма VRC-RZ2 позволяющие получать высокоактивные суспензии вируса бешенства.

Подобрана оптимальная поддерживающая среда и отработаны оптимальные параметры для культуры клеток ВНК-21с13 в суспензионных условиях культивирования.

Определена воспроизводимость вируса при крупномасштабном культивировании.

Подобран оптимальный состав приманки для пероральной вакцинации диких животных обитающих на территории Жамбылской области.

Изучены иммуногенные свойства вакцинного штамма вируса бешенства для диких плотоядных животных.

Проведена оценка эффективности и безопасности пероральной вакцины на диких плотоядных животных. Результаты проведенных работ позволяют рекомендации по использованию данный штамм вируса в качестве основы для оральной вакцины против бешенства. Новизна полученных результатов подтверждена патентом на способ изготовления вакцины пероральной антирабической против бешенства диких плотоядных животных №101894 от 30.09.2015., патентом №99704. от 12.08.2019.

Иммунобиологические свойства вакцины из культурального штамма вируса бешенства штамма VRC-RZ2, изученные в ходе экспериментов, показали эффективность данного препарата в защите против патогенного штамма CVS.

**Область применения:** ветеринарная биотехнология.

**Ершебулов Закир Джапаровичтин 03.01.06 - биотехнология адистиги боюнча биология илимдердин кандидаты даражасын алуу үчүн "Жапайы жырткыч жаныбарлардын оозу аркылуу берилүүчү кутурмага каршы вакцинаны өндүрүү технологиясын өркүндөтүү" диссертациясынын корутундусунун**

## РЕЗЮМЕСИ

**Негизги сөздөр:** Кутурма, жапайы жаныбарлар, вакцина, жем, иммунитет, коопсуздук, клеткалардын штаммдары, патогендүүлүгү, өстүрүү.

**Изилдөөнүн объектиси:** кутурма вирусунун штаммдары жана кутурмага каршы ооз аркылуу берилүүчү вакцина.

**Изилдөөнүн предмети:** кутурмага каршы вакцина.

**Иштин максаты:** жапайы жырткыч жаныбарлардын арасында кутурма оорусун алдын алуу үчүн кутурмага каршы вакцинаны өндүрүү технологиясын өркүндөтүү.

**Изилдөөнүн методдору жана аппараты:** клеткаларды жана вирусту суспензия менен өстүрүү, вирус антигенин иммунофлуоресценция жолу менен аныктоо, биопроба, биотехнологиялыкметоддору, серологиялык методдору.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңылыгы:** Казакстанда биринчи жолу суспензия менен өстүрүү методу масштабга келтирилди жана VRC-RZ2 штаммын асма өстүрүү оптималдуу параметрлери иштелип чыкты, бул кутурма вирусунун жогорку активдүүлүгүн алууга мүмкүнчүлүк берди.

Оптималдуу колдоочу шайман тандалып алынып, суспензия өстүрүү шартында BHK-21c13 клеткаларын өстүрүү үчүн оптималдуу параметрлер иштелип чыккан.
Кеңири масштабда өстүрүүдө вирустун репродуктивдүүлүгү аныкталды.
Жамбыл облусунда жашаган жапайы жаныбарларды оозеки эмдөө үчүн жемдин оптималдуу курамы тандалып алынды.
Жапайы жырткычтар үчүн кутурма вирусуна каршы вакцина штаммынын иммуногендик касиеттери изилденген.
Жапайы жырткыч жаныбарлар оозеки вакцинасынын натыйжалуулугуна жана коопсуздугуна баа берилди. Жүргүзүлгөн иштин натыйжалары бул вирус штаммын оозеки кутурмага каршы эмдөөнүн негизи катары сунуштоого мүмкүндүк берет.
**Колдонуу боюнча сунуштар:** Алынган натыйжалардын жаңылыгы 30.09.2015-жылы чыккан No101895 жапайы жырткыч жаныбарлардын кутурма оорусуна каршы ооз аркылуу берилүүчү вакцинасын өндүрүү методикасынын патенти менен тастыкталды.
Эксперименттердин жүрүшүндө изилденген кутурма вирусунун VRC-RZ2 штаммынан алынган вакцинанын иммунобиологиялык касиеттери бул препараттын патогендик CVS штаммынан коргоодо эффективдүүлүгүн көрсөтүлдү.
**Колдонуу тармагы:** ветеринардык биотехнология.

## RESUME
## to dissertations of Yershebulov Zakir Dzhaparovich on the theme: "Improving the technology of manufacturing the-rabies oral vaccine for wild carnivores" for the degree of candidate of biological Sciences in the specialty 03.01.06-Biotechnology

**Key words:** Rabies, wild animals, vaccine, bait, immunity, safety, cell culture, pathogenicity, cultivation.
**Object of research:** rabies virus strains and oral rabies vaccine.
**Subject of research:** The aim of the work is he improvement of the manufacturing the technology and testing rabies vaccine for prevention of rabies among wild carnivores.
**Research methods and equipment:** suspendeng cell and virus culturing, detection of virus antigen by immunofluorescence, bioassay, biotechnological methods, serological methods.
**The results obtained and their novelty:** For the first time in Kazakhstan, the method of suspended cultivation was scaled and the optimal parameters of suspension cultivation of the VRC-RZ2 strain were worked out, allowing to obtain highly active suspensions of the rabies virus.
The optimal supporting medium was selected and the optimal parameters for the culture of BHK-21c13 cells under suspension culture conditions were worked out.
The reproducibility of the virus in large-scale cultivation was determined.
**Recommendation for use:** The optimal composition of the bait for oral vaccination of wild animals living in the territory of the Zhambyl region was selected.

The immunogenic properties of the rabies virus vaccine strain for wild carnivores were studied.
The effectiveness and safety of the oral vaccine in wild carnivores were evaluated. The results of these studies allow us to recommend this strain of the virus as the basis for an oral rabies vaccine. The novelty of the obtained results is confirmed by the patent for the method of manufacturing an oral rabies vaccine against rabies of wild carnivorous animals No. 101894 dated 30.09.2015.
The immunobiological properties of the vaccine from the culture strain of the rabies virus strain VRC-RZ2, studied during experiments, showed the effectiveness of this drug in protecting against the pathogenic strain CVS.
**Scope of application:** veterinary biotechnology

1625 академиялык басылмалар
Тиражы 120 нуска. № 247 буйрук
«Алтын Принт» ЖЧК басмаканасы
720000, Бишкек көч. Орозбекова, 44
Тел.: (+996 312) 62-13-10
e-mail: altyntamga@mail.ru