**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН
САЛАМАТТЫКТЫ САКТОО МИНИСТРЛИГИ
И.К. АХУНБАЕВ АТЫНДАГЫ
КЫРГЫЗ МАМЛЕКЕТТИК МЕДИЦИНАЛЫК АКАДЕМИЯСЫ**

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН
УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫНЫН
БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТУ**

Диссертациялык кеңеш Д 03.17.558

Кол жазма укугунда
УДК 578.823.2

Жугунисов Куандык Даулетбаевич

БЛУТАНГ ЫЛАҢЫНЫН ПРОФИЛАКТИКАЛЫК КАРАЖАТТАРЫ ЖАНА АГА КАРШЫ ВАКЦИНА ДАЯРДОО ТЕХНОЛОГИЯСЫН ЖАКШЫРТУУ

03.01.06 – биотехнология

Биология илимдеринин кандидаты илимий даражасын
изденип алуу үчүн жазылган диссертациянын
автореферады

Бишкек – 2019

Диссертациялык иш Казакстан Республикасынын билим берүү жана илим министрлигинин Илим комитетине караштуу «Биологиялык коопсуздуктардын көйгөйлөрү илим-изилдөө институтунда» жана Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунда аткарылды.

Илимий жетекчи:	**Жунушов Асанкадыр Темирбекович** ветеринария илимдеринин доктору, профессор, КР УИАнын мүчө-корр., Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун директору
Расмий оппоненттер:	**Серикбаева Асия Демеухановна** биология илимдеринин доктору, Казак Улуттук агрардык университетинин технология жана тамак-аш азыктарынын коопсуздугу кафедрасынын профессору
	Нургазиева Асель Рысбековна биология илимдеринин кандидаты, А. Дуйшеев атындагы Кыргыз илим-изилдөө Ветеринария институтунун вирусология жана биотехнология лабораториясынын улук илимий кызматкери
Жетектөөчү (оппоненттик) уюм:	Казакстан Республикасынын билим берүү жана илим министрлигинин Илим комитетине караштуу Улуттук биотехнология борбору (010000, Нур-Султан шаары, Кургальжин көчөсү, 13/5).

Диссертацияны коргоо 2019-жылдын 24-майында саат 12.00 И.К. Ахунбаев атындагы Кыргыз мамлекеттик медициналык академиясына жана Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтуна караштуу Д 03.17.558 диссертациялык кенештин отурумунда өткөрүлөт (дареги: 720020, Бишкек ш., Ахунбаев көчөсү, 92а), конференция залы, онлайн режиминдеги коргоонун коду ZOOM webinar 8607586340.

Диссертация менен И. К. Ахунбаев атындагы Кыргыз мамлекеттик медициналык академиясынын (720020, Бишкек ш., Ахунбаев көчөсү, 92а), Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун (720071, Бишкек ш., Чүй проспекти, 265) китепканаларынан жана http://kgma.kg сайтынан таанышууга болот.

Диссертациялык кеңештин
окумуштуу катчысы м.и.к., доцент **Сабирова Т. С.**

ИШТИН ЖАЛПЫ МҮНӨЗДӨМӨСҮ

Диссертациянын темасынын актуальдуулугу. Блутанг - (койдун катаралдык безгеги) кан соруучу чиркейлердин *Culicoides* түрүнөн жугуучу кепшөөчү жаныбарлардын трансмиссивдик, вирустук жугуштуу ооруу болуп саналат. Бул ооруу мал-чарбачылык азык-түлүктөрү менен жаныбарлардын эл аралык деңгээлдеги соода-сатык чөйрөсүндөгү олуттуу социалдык-экономикалык көйгөйлөрдү жаратат (Кухаркина О.В. ж.б., 2010; Jacquot M. etall, 2017).

Блутанг (БТ) көптөгөн өлкөлөрдө катталган, алардын катарына Россия жана Кытай мамлекеттери да кирет (Луницын Ф.В., 2008; Kirkland P.D. etall., 2002). Акыркы жылдары Кыргызстандан, Казакстан менен Монголиядан серопозитивдик жаныбарларды кезиктирүүгө болот (Муруева Г.Б., 2011; Lundervold M., 2004; Avci Oetall., 2014).

Блутангдын вирустары (БТВ) үчүн эпизоотика аралык мезгилинде табийгый резервуар болуп ИММ, жапайы кепшөөчү жаныбарлар жана үй жаныбарларынан эчкилер эсептелинишет (Luedke A.J. etall., 1969; Luedke A.J., 1977). Негизги вирусту ташуучулар болуп кан соргуч чымындардын (гнус) компонентерине кирүүчү чагуучу майда кан соргучтар түркүмү саналат (Venter G.J. etall., 2015). Бул жагдай оорунун табигый булагын, мүнөзүн аныктайт. Айлана-чөйрөнү курчап турган абанын жогорку температурасы жана ашыкча нымдуулук жугуштуу ооруларды оңой кабыл алуучу жаныбарлардын жана курт-кумурскалардын жайдагы массалык фактору болуп эсептелинет (Jacquot M. et all, 2017).

Ошондуктан, блутангдын мындан кийинки дагы жайылуусун токтотуу максатында эпизоотикага карама-каршы иш-чаралардын системасынын абдан маанилүү жана татаал маселелери болуп жугуштуу ооруларды оңой кабыл алуучу жаныбарлардын атайын алдын алуусу саналат.

Блутангдын алдын алуу үчүн аттенуирдик штаммдардан даярдалган тирүү вакциндердин ар кандай түрлөрү иштелип чыкты (Alexander R.A. et all., 1951; Cox H.P. et all., 1954). Бирок, тирүү вакциналардын жогорку натыйжа бергендигине карабастан, БТ менен көп жабыркаган өлкөлөргө колдонууга сунушталбайт, анткени, алып жүрүүчү организм аркылуу вакциндик штаммдар рекрутирлениши мүмкүн жана патогендүү формага айланып, андан кийин сыркоонун оор формасына өтөт (Foster M.M. et all. 1980). Ошондуктан, инактивацияланган вакциналарды колдонуу бир кыйла коопсуз болуп эсептелинет жана көптөгөн европа өлкөлөрүндөгү очокторду көзөмөлдөөгө тажрыйба жүргүзүлүп, вирустун канда айланышына жана төмөндөшүнө мүмкүнчүлүк түзүлөт (Noad R. et all, 2009).

НИИПББда вирустук БТга каршы 4 жана 16 серотиптерге вакцина

иштелип чыккан. Бирок, бул дары (препарат) койлор үчүн гана иштелип чыккан, эмделгенден кийин жаныбарларда иммунитет 6 айга чейин созулат (Абдураимов Е.О., 2016). Эл аралык эпизоотикалык бюронун (ЭЭБ) талаптарына ылайык, БТга каршы вакциналар берилгенде, эмделген жаныбарлардагы иммунитеттин сакталып турушунун узактыгы 1 жылдан кем эмес болот (OIE, 2000).

Бул маселелерге байланыштуу, биздин изилдөөнүн максаты инактивацияланган биваленттик вакциналарга каршы 4чү, 16чы серотиптерге жакшыртылган технологияларды иштеп чыгуу аркылуу ири мүйүздүү жаныбарлар (ИМЖ) менен майда мүйүздүү жаныбарлардагы (ММЖ) жана иммуногендик натыйжалуулукту изилдөө.

Диссертациянын темасынын приоритеттик илимий багыттары ири илимий программалары (долбоорлору), негизги илим изилдөө иштери, билим берүү жана илим-изилдөө мекемелери менен болгон байланыштары. Диссертациялык иш Казакстан Республикасынын билим берүү жана илим министрлигинин Илим комитетинин республикалык илимий гранттарынын негизинде аткарылды (№0109РК00450; №0112РК00306), ошондой эле, Казакстан Республикасынын билим берүү жана илим министрлигинин Илим комитетинин 2016-2018-жылдардагы KZ-32 «Prevalence of *Brucella* species and bluetongue virus serotypes among domestic livestock or ruminants in Southern Kazakhstan» Эл аралык долбоорунун алкагында аткарылды.

Изилдөөнүн максаты. Изилдөөнү жүргүзүүдө инактивацияланган биваленттик эмульгирленген вакциналарды БТга каршы өркүндөтүү технологиясын даярдоо жана ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарлардагы иммуннобиологиялык касиеттерин изилдөө.

Изилдөөнүн милдеттери:

1. Казакстандын түштүк аймактарындагы сезимтал жаныбарлардын вирустук БТга болгон антиденечелеринин эпидемиологиялык жагдайын изилдөө;

2. клеткаларды ылгап өстүрүү жана вирустук БТнын суспензиялык өстүрүү шарттарын өнүктүрүү;

3. вирустук БТ бета-пропиолактон (БПЛ) менен инактивация режимин өнүктүрүү;

4. адъюванттык курамды өнүктүрүү жана инактивацияланган вакцинанын эксперименталдык сериясын даярдоо;

5. иммундаштыруунун өлчөмүн аныктоо, өнүктүрүлгөн вакцинаны киргизүү ыкмасы, ошондой эле ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарлардагы иммунитеттин узак сакталышы;

6. жарактуулук мөөнөтүн изилдөө жана вакцинанын ар кандай

температурага жана жыл мезгилдерине туруктуулук режими;

7. вакцинаны даярдоодогу комиссиялык сыноо технологияларын өнүктүрүүнү, нормативдик-техникалык иш кагаздарын (НТИ) бекитүүнү жана аларды иштеп чыгууну иш жүзүнө ашыруу.

Алынган жыйынтыктардын илимий жаңылыгы. Казакстандын түштүк аймагында инфекциянын алдын алуу боюнча жана ага тез реакция кылуу үчүн биринчи жолу айыл чарба жаныбарларына толук кандуу серомониторинг жүргүзүлгөн. Жыйынтыгында Казакстандагы блутангдын эпидемиологиялык абалы аныкталды.

Алгачкы жолу Казакстанда вирустук БТга 4 жана 16 серотиптерге каршы бивиленттик инактивацияланган эмульгирленген вакцина иштелип чыккан, жаңы коммерциялык майлуу адъювантты Montanide™ ISA-71VG пайдалануу менен, ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарларга жүргүзүлгөн тажрыйбада анын иммунобиологиялык касиеттери өздөштүрүлгөн, ошондой эле протективдик натыйжалуулугуна баа берилген.

Суспензиялык ыкма менен өстүрүлгөн вирус репродукциялоочу жана өрчүтүлгөн ВНК-21 жана El-4 үзгүлтүксүз клеткалык түзүлүшүнүн технологиялык өзгөчөлүктөрү аныкталган. Изилдөөнүн жыйынтыгында өрчүтүлгөн ВНК-21 тандалган, андан биологиялык активдүүлүгү бир кыйла жогору болгон вирусту алуу мүмкүнчүлүгү бар.

Жүргүзүлгөн эксперименттин жыйынтыгында БПЛ пайдалануу менен максималдуу антигендик активдүүлүктү сактоочу инактивацияланган оптималдуу вирустук БТнын параметрлери тандалган.

Кзахстан Республикасынын Юстиция министрлигинин Интеллектуалдык менчик укуктары боюнча Комитети тарабынан берилген изилдөөнүн жаңылыгы боюнча ойлоп табуулар 5 автордук күбөлөр менен тастыкталган (№63210, 63307, 71197, 75809, 75814)

Алынган жыйынтыктардын практикалык маанилүүлүгү. Өткөрүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгында вирустук БТ 4 жана 16 серотиптерге каршы вируленттик штаммдардан вакцина даярдоочу технология өнүктүрүлүп, ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарлар үчүн жогорку иммуногендик, коопсуздалган жана натыйжаланган бивиленттик ири вакцинаны алуу мүмкүнчүлүгү ишке ашырылды. Бул профилактикалык биопрепаратка карата нормативдик-техникалык иш кагаздары түзүлдү жана тастыкталды.

Алынган жыйынтыктардын экономикалык маанилүүлүгү. Вакцинаны иш жүзүндө колдонуу вирустук БТга каршы иммунопрофилактикалык иш-чараларды өткөрүүгө мүмкүнчүлүк берет, ал эми ооруу күчөп бараткан учурда дароо жок кылуу керек. Вирустук БТга каршы вакцинанын 1 дозасынын наркы бул технология боюнча чет өлкөлүк аналогдорго салыштырмалуу 7 эсеге аз болуп, 55,8 тенгени түзөт.

Диссертациянын коргоого чыгарылган негизги жоболору. ВНК-21 өндүүлгөн клеткаларында вирустук БТ 4 жана 16 серотиптеги суспензиялык өстүрүлгөн параметрлерин оптималдаштыруу.

Вирустук БТнын 4 жана 16 серотиптүү БПЛ штаммдарын инактивацияланган режимде эпизоотикалык жактан жакшыртуу.

ГОА менен сапониндин иммуностимулдук касиеттерин жана инактивацияланган бивалентттик вакцинанын курамындагы БТга каршы жаны майлуу адъювантты Montanide™ISA-71VG салыштырмалуу изилдөө.

Ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарлардын 4 жана 16чы серотиптерге каршы бивалентттик инактивацияланган эмульгирленген вакцинасынын иммуногендик натыйжалуулугун өздөштүрүү .

Изденүүчүнүн жеке салымы. Диссертациялык иштин бардык бөлүмдөрү автордун жеке катышуусу менен аткарылды. Мониторингдин жүргүзүлүшүн өздөштүрүүдө айрым этаптары боюнча изилдөөдө, вирустук БТнын суспензиялык ыкма менен өстүрүүдө жана анын инактивациясынын биологиялык магистрлеринин курамындагы Ершебулов З.Д., Таранов Д.С. жана ветеринария илиминин доктору Абдураимовдор Е.О. менен биргеликте жүргүзүлгөн тажрыйбага кошкон салымдарына автор ыраазычылыгын билдирет.

Изилдөөнүн жыйынтыктарынын апробациялары. Диссертациялык иштин жыйынтыктарындагы негизги материалдар: Биологиялык коопсуздуктардын көйгөйлөрү илим-изилдөө институтунун 50-жылдык юбилейине арналган Эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Алматы, 2008); БиоТех Астана аттуу Ічи Эл аралык конференциясында (Астана, 2008); «Ветеринардык медицинанын, тамак-өнөр жайынын, айыл чарбадагы биотехнологиянын актуалдуу проблемалары» деген Эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Павлодар, 2008), БиоТех Астана аттуу IIчи Эл аралык конференциясында (Астана, 2011); «Экзотикалуу жана зооантропоноздуу жаныбарлардын өтө коркунучтуу оорулары менен заманбап күрөшүү көйгөйлөрү» аттуу профессор Н. Асановдун 70-жылдык юбилейине арналган Эл аралык илимий-практикалык конференциясында (Алматы, 2012) баяндалып талкууланды.

Диссертациянын жыйынтыктарынын толук чагылдырылышы. Изилдөөнүн жыйынтыгында 11 илимий иш жарык көрүп, анын ичинде 2 илимий макала РИНЦтин мезгилдүү илимий басылмаларындагы журналдарда басылып чыккан, Аткарылган иштин жыйынтыгында 5 автордук күбөлүк алынган.

Диссертациянын түзүмү жана көлөмү. Диссертация компьютерде терилген 196 беттен жана бөлүмдөрдөн: киришүү, адабий серептерден, жеке изилдөөнүн жыйынтыгынан, тыянактардан жана практикалык сунуштардан

турат. Колдонулган адабияттын тизмеси 199 булактан турат да, анын ичинде 121 булак чет элдик авторлордуку. Мындан тышкары, 35 сүрөттөр жана 29 таблицалар көрсөтүлгөн. Аткарылган изилдөөнүн аныктыгын тастыктаган 10 тиркеме көрсөтүлгөн.

ИШТИН НЕГИЗГИ МАЗМУНУ

Киришүүдө Эл аралык эпизоотиялык бюронун талабына ылайык илимий иштин актуалдуулугу жана вирустук БТга каршы вакцинаны даярдоо технологиясын өркүндөтүү зарылдыгы көрсөтүлгөн.

I бөлүмдөгү адабий серепте ата мекендик жана чет элдик адабияттардын булактарында оорунун жайылтылышы, экономикалык зыяндуулугу, вирустун биологиялык касиеттери, эпизоотиялык жагдайы, эпизоотияга каршы иш-чаралары, спецификалык профилактикалары, ошондой эле бул ооруга каршы классикалык технология менен вакцинаны даярдоо көрсөтүлүп жана анализ берилген.

II бөлүмдөгү «Изилдөөнүн материалдары жана ыкмаларында» вирусологиялык, биотехнологиялык жана изилденүүчү обьекттердин иммунологиялык ыкмалары келтирилген.

2007-жылы мониторингдик изилдөөдө Таджикстан Республикасындагы ооруган койлордон бөлүнүп чыккан вирустук БТ 4 жана 16 серотиптеги вируленттик штаммдар иш жүзүндө колдонулган.

Изилдөө объектиси БТ ыланынын 4 жана 16 серотиптеринин вируленттик штаммдары жана вакцина даярдоо технологиясы болуп табылат.

Изилдөө предмети

1. БТ виурсунун 4 жана 16 серотиптеринин культуралдык касиеттери.
2. Вакцина даярдоо учун адъюванттардун иммуностимулдик эффектүүлүгү.
3. Блутанг ыланына каршы даярдап чыккан вакцинанын жаныбарлардагы иммуногендик активтүүлүгү.

Вирустук блутангды өөрчүтүү жалпы кабыл алынган ыкма менен ВНК-21 үзгүлтүксүз клеткаларды өстүрүү боюнча жүргүзүлөт. (37,0±0,5)°С инкубированланган температурада клеткаларга 0,1 ТЦД$_{50}$/кл дозасында жуктурулган.

Вирустун инактивациялануусу. Вирус 12 сааттын ичинде БПЛ 0,1% концентрациясы менен инактивацияланды. Вирустун БТнын толугу менен инактивацияланышы 3 жолку пассирлөө жолунда Vero клеткасын өөрчүтүү менен аныкталды, ошондой эле 2-3 күндүк сүт эмүүчү майда чычкандарга интрацеребралдык жол менен жуктурулду.

Вакцинанын түзүлүшү. Инактивациялык серотиптерди бирдей антигендик жүктө бириктирип, андан кийин вакцинаны майлуу адъювантты Montanide ISA-71VG менен бириктирилген жол аркылуу даярдалды жана

вирустук БТ инактировандык антигендин салмагы 7:3 катышында, лабораториялык эмулсордун (7-10 мин. ичинде 3000 көл/мин.) жардамы менен эмульсия даяр болгуча дыкаттык менен аралаштырабыз.

Ири мүйүздүү жаныбарлар менен майда мүйүздүү жаныбарлардын ар кандай жаштагы жергиликтүү тукумдардын, ийгиликтүү чарбадагы курч инфекциялык оорулуулары жеткирилип, ***вакцинанын иммуногендүүлүгүнө жана коопсуздугуна*** баа берилди.

Вакцинанын коопсуздугун койлордун булчуңуна саюу ыкмасы менен текшердик. Вакцинаны койдун санынын ички тарабынан 5 мл берилген.

Вакцинанын иммуногендүүлүгүн оорубаган, эмделбеген койлордо, эчкилерде жана жашы 6-12 айлык, семиздиги орто жана жогорку торпоктордо текшеришкен. Вакцинаны кой жана эчкилерге 1 мл булчуңга сандын ички тарабынан беришкен, ал эми торпокторго 2 мл үчүнчү моюн омурткасынын айланасына беришкен. Көзөмөлдүк жаныбарлардын группасын вирустук БТга каршы эмдебей калтырдык. Бардык жаныбарлардын группасын 360 күндүн ичинде байкоого алынды. Байкоо убагында ар бир айдын аралыгында антиденечелердин РН жана ИФАда калыптандыруу динамикасын өздөштүрүү үчүн кандын плазмасын алдык. Эмделгенден кийин 4 жана 16 серотиптеги эки эппизотиялык штаммдары менен 5 мл дозасында вирус көк боор гомогендик аралашмасы жана вируленттүү кан менен көзөмөлдүк жугузууну жүргүзүлдү, ал эми вирустун титри 10^3-10^4 $ИД_{50}$/мл барабар болгон. Бир эле убакытта ошондой эле дозада эмделбеген жаныбарларга жуктурушкан. Жаныбарлардын реакциясын ооруунун белгилерин баалоо 30 баллдык шкала менен эске алынды (Сергеев, 1974). Көзөмөлдүк жана эмделген жаныбарлардын иммунитетинин туруктуулугун клиникалык реакциянын айырмасы менен бааладык: иммунитеттин жоктугу - 0-7 балл, алсыз иммунитет - 7-12 балл, орточо иммунитет – 12-16 балл, көрүнүп турган иммунитет - 16 баллдан жогору.

Бардык статистикалык анализдер GraphPadPrism® 6.0 версиясында жүргүзүлгөн. Жаныбарлардын дене табынын температурасын орто эсеп менен эске алып, серологиянын маалыматтары, жаныбарлардын клиникалык белгилери стандарттык каталар менен чыгарылды. Бардык жарыяланган көлөмдөрдүн маанилүүлүгү критериялык босогодон ($p<0,05$) кем эмес болду.

III бөлүмдөгү «Изилдөөнүн өздүк жыйынтыктарында» Казакстандын түштүгүндөгү вирустук БТга антиденечелердин болушу жаныбарлардын серомониторингдик изилдөөсүндө көрсөтүлгөн. Жүргүзүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгында ИМЖ вирустук БТгы кандын плазмасында 11,8 % антиденече камтылган, ошондой эле ММЖ 14,21 % кандын плазмасында оң болуп чыккандыгы вирустук БТ берилген аймактарда бар экендиги жөнүндө далилдеп турат.

БТга каршы эксперименталдык сериянын даярдоосу үчүн алынган биомассанын вирусу. Биздин изилдөөнүн биринчи этабында суспензиялык

шарттарда BHK-21 жана EL-4 клеткаларынын өөрчүп-өсүү жөндөмдүүлүгүн аныктоо болгон. Жүргүзүлгөн изилдөөлөр клеткалардын динамикалык топтолушун BHK-21ди колдонгондо 3 күнү, EL-4тү колдонгондо 4чү күнү чокуга чыкканын көрсөтүп, андан соң клеткалардын өсүшү токтоп жана жашоого болгон жөндөмдүүлүгү төмөндөгөн. Ошентип, экөөнү тең суспензиялык шарттарда өстүрүүгө болорун, мыкты тажрыйба жолу менен аныктадык. Бирок, тиешелүү түрдө активдүү биомассасынын чыгуусу жана кийинки этаптарда вирустук БТга болгон клетканын сезгичтигин өздөштүрүү керек болгон.

Вирустук БТнын өрчүтүү шарттарын аныктоодо биореактордогу бурганактап аралаштырган ылдамдыгын, клетканын концентрациясын жана вирустун өөрчүшүнүн узактыгы изилденди. Тажрыйбанын жыйынтыгы 1 таблицада көрсөтүлгөн.

1 таблица – BHK-21 жана EL-4 клеткаларынын БИОК-022с биореактордогу өөрчүп-өсүүсүндөгү вирустук БТнын активдүүлүгү

Пассаждык денгээл	Биологиялык активдүүлүк, lg ТЦД$_{50}$/см^3 (X±m), n=3				p-мааниси
	EL-4		BHK-21		
	4-серотип	16-серотип	4-серотип	16-серотип	
1	4,12±0,07	4,25±0,08	6,75±0,10	6,81±0,16	<0.0001
2	6,58±0,22	6,81±0,12	6,33±0,22	6,55±0,12	0.02
3	6,16±0,22	6,75±0,07	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
4	5,83±0,08	5,91±0,16	7,75±0,10	7,25±0,11	<0.0001
5	4,91±0,16	5,12±0,13	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
6	4,83±0,08	5,25±0,11	7,66±0,08	7,25±0,11	<0.0001

Өткөрүлгөн вирустук БТнын өөрчүлүшү боюнча тажрыйбанын жыйынтыгында клетканын суспензиялык сызыгы өздөштүрүлүп, белгиленген клеткалардын жогорку пролиферативдик касиеттери, биринчи пассаждан баштап вирустун массасы жогору репродукцияланган. Ошондуктан вирустун жогорку титрлери BHK-21дин клетканын өөрчүлүшүндө топтолгон. Ошондуктан вирустун титрлерине жараша клетканын өөрчүшүнүн олуттуу айырмачылыктар кездешти (p<0.0001).

Кийинки эксперименттерде вирустук БТнын топтолуш туруктулуугунун деңгээлин аныктоодо, EL-4 клеткаларынын пассажында санынын көбөйүүсү, вирустун титри ар бир пассажда олуттуу түрдө төмөндөйт (p<0.0001).

Кийинки тажрыйбанын серияларында инфекцияланган дозага жараша вирустун репродукциясы, өөрчүлүүнүн узактыгы өздөштүрүлгөн. Бул максат менен BHK-21 клеткасын 0,1; 0,2 и 1,0 ТЦД$_{50}$/кл дозасында ВБТ жуктурулган. 0,2 ТЦД$_{50}$/кл (4 - 5 кун) инокуляциясына караганда, 0,1 ТЦД$_{50}$/кл минималдуу

жугуштуу дозасында өөрчүү процесси 1-2 күнгө (до 6-7 күн) узартылат. Эң көп вирустун титр топтолусу 0,2ТЦД$_{50}$/кл 4-6-чы өрчүтүү күндөрүндө - 6,00 ÷ 7,83lg ТЦД$_{50}$/см^{3} жуктуруу дозасында байкалган. 1,0 ТЦД$_{50}$/кл жуктуруу дозасынын көбөйүүсү культуралдык суспензияда вирустун титрин топтоп, көбөйүшүнө алып келген эмес. Ошондой эле 0,2 ТЦД$_{50}$/кл дозасында өрчүтүлгөн клетканы жуктурууда вирустун биомассасында биологиялык вирус титринин активдүүлүгү максималдуу ($P<0{,}05$) көрсөткүчтөрү болгон жана анын статистикасы башка жуктурулган дозаларына караганда жогору көрсөткөн (0.1 ж е1.0 ТЦД$_{50/кл}$). Бул адабияттар боюнча биз кабыл алынган жыйынтыктарга туура келет, 0,1 ден баштап 0,2 чейин ТЦД$_{50}$/кл ВБТнын башка вакцина штаммдарында оптималдуу жугузуу дозасы болгон. Кийинки тажрыйбаларга таянып 0,1 ÷ 0,2 ТЦД$_{50}$/кл жуктуруу дозасы колдонулган.

Кийинки тажрыйбанын серияларында өзгөрүүсү жок орто суспензиялык шартта өсүүнү колдоо менен өзгөрүүсү ВНК-21 клеткасынын өсүүсүн вирус топтоо мүмкүнчүлүгүн изилдеп чыктык. Изилдөөнүн жыйынтыгы 2 таблицада көрсөтүлгөн.

2 таблица – Өстүрүүнүн суспензиялык ыкмасындагы вирустук БТ репродукциясына болгон азыктык чөйрөнүн алмашуу таасири

Протокол	Өстүрүү убактысы, ч	Вирустун дозасы, ТЦД$_{50}$/кл	Вирустун титри, lg ТЦД$_{50}$/см^{3}	Антигендин активдүүлүгү, $\log_2$
Азык чөйрөсүндөгү өзгөрүүнүн жоктугу	96	0,1	5,6 ± 0,33	3.0
Азык чөйрөсүндөгү өзгөрүүлөрдүн болушу	120	0,1	7,25±0,14	5.0

2 таблицада көргөтүлгөндөй, вирустук БТнын репродукцияланышына суспензиялык шартта өстүрүлгөндө чөйрөнүн өзгөрүүсү бир кыйла таасирин берет. Ошентип, 1 күндүк өрчүтүү мөөнөтүнөн кыскартылса азыктандырылган чөйрөнү алмаштырбаса 5,6±0,33 lg ТЦД$_{50}$/см^{3} жана 3 $\log_2$ вирустун биологиялык жана антигендик активдүүлүгү төмөндөйт, суспензиялык азыктандырылган чөйрөнү алмаштыруу менен салыштырганда тиешелүү түрдө 7,25±0,14 lg ТЦД$_{50}$/см^{3} жана 5 $\log_2$ катыштагы активдүүлүгүн түзөт.

Кийинки тажрыйбанын серияларында суутек иондорунун (pH мааниси) таасирдүүлүгүнүн концентрациясы менен вирусту чөйрөдө топтоонун өлчөмүнүн колдоосун аныктадык. Тандалган тажрыйбанын серияларындагы оптималдуу pH ПСС азыктандырылган чөйрөнүн көлөмү 6,9 баштап 8,0 чейин диапозонунда өткөрүлгөн. Алынган жыйынтык 3 таблицада көрсөтүлгөн.

3 таблица – Өстүрүүнүн суспензиялык шарттарындагы клеткалык өстүрүүдөгү ВНК-21 вирустук БТ репродукциясын колдогон чөйрөнүн pH болгон таасирлери

pH чөйрөлөрү	Вирустун титрлери, lg $ТЦД_{50}/см^3$	ИФАгы антигендин активдүүлүгү
6,9- 7,1	5,67±0,08	1:16
7,2-7,4	7,33±0,08	1:64
7,5-7,7	6,42±0,08	1:32

3 таблицада көрсөтүлгөндөй, ВНК-21 өрчүтүлгөн клеткасында 7,2 баштап 7,7 чейинки маанисинде вирус түрдө активдүү репродуцияланышат. Ошол эле убакытта pH чөйрөнүн кычкыл тарабына өзгөрүлүүсү, вирустун топтолуу өлчөмүнүн төмөндөшүнө алып келет.

Ошентип, вирустук БТны ири масштабдуу өстүрүү үчүн оптималдуу 7,2-7,7 pH чөйрөсү сунушталат, анткени бул pH мааниси вирустук БТнын репродукцияланышына ылайыктуу.

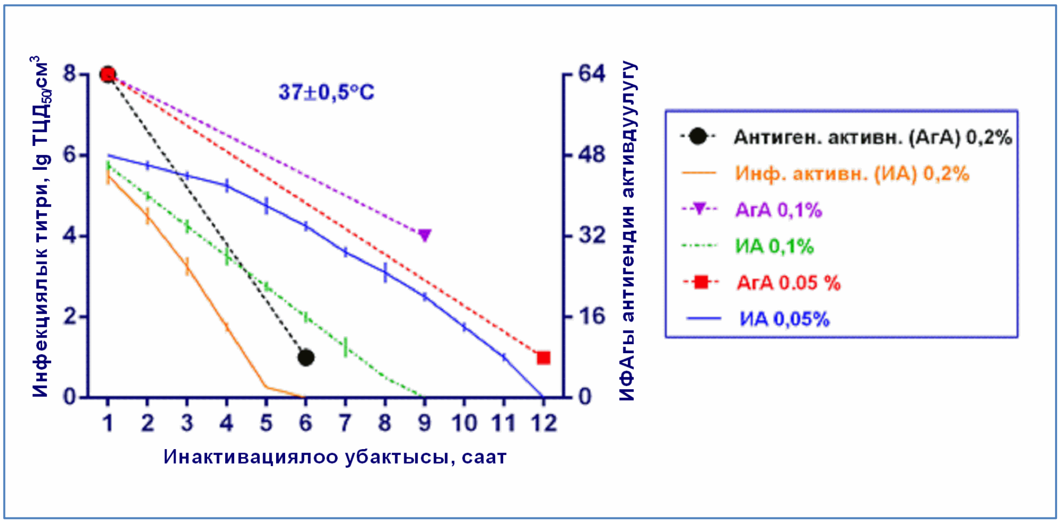
Ошондуктан, изилдөөнүн жыйынтыгында клеткалык субстрат (ВНК-21) аныкталган, ошондой эле вирус камтыган суспензияны 7,50÷7,75 lg$ТЦД_{50}$/мл биологиялык активдүүлүгү менен алууга мүмкүнчүлүк берген вирустук БТны (0,1ден 0,2 чейин $ТЦД_{50}$/кл жугузуу дозасы, ИМЖ кандын плазмасында - 5% чөйрөдө колдоосу, 37°С температурасында 120 сааттын ичинде инкубациялануу), өөрчүтүүдөгү оптималдуу параметрлери аныкталган.

Диагностикалык жана профилактикалык препараттарды даярдоо үчүн

ири масштабдуу өөрчүтүлгөн жогорку активдүү вирус камтыган материалдар көрсөтүлгөн жарактуу параметрлерди сактоого мүмкүнчүлүк берет.

БТка каршы вакцинаны даярдалышы үчүн вирустун инактивацияланышы. Биздин кийинки ишибиздин максаты вирустук БТ БПЛнын инактивация режимин жакшыртуу, инактиванттын концентрациясынын таасирин, pH реакциялык чөйрөсүн, температурасын, инактивациялык процессинин узактыгын изилдөө жана бул берилген параметрлери, вирустун антигендик касиеттерине таасирдүүлүгү тастыктоо.

Вирустун инактивацияланышы (2-8), 22 жана 37^0 С температурада 0,05%, 0,1% жана 0,2% БПЛ колдонулуп, өткөрүлгөн. Анткени, 2-8^0С жана 22^0С температурасында бардык сыналган концентрацияларында инфекциянын сакталышы жана антигендик активдүүлүгүнүн жоголушу байкалган.



1 сүр. (37±0,5) ^{0}С температурдагы вирустук БТ инактивациянын кинетикасы.

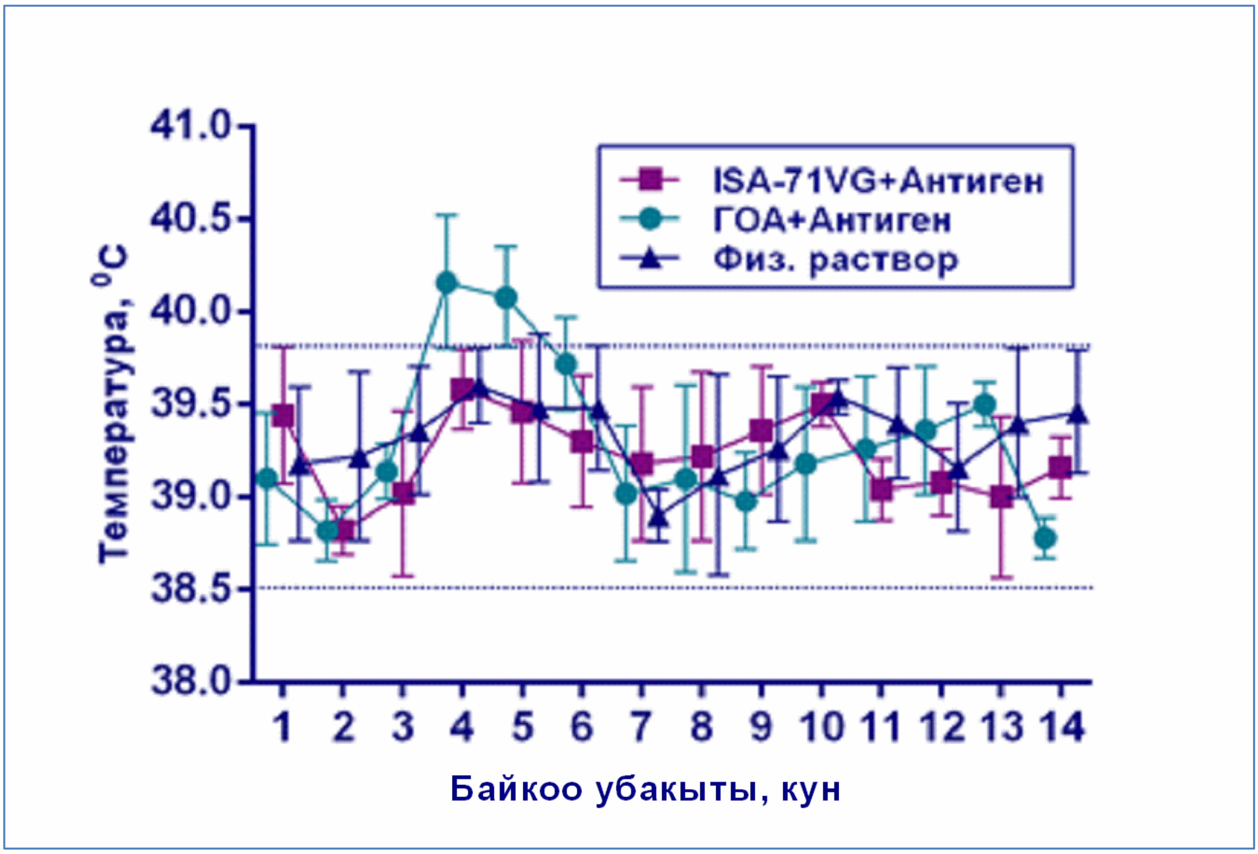
1 сүрөттүн маалыматтарында көрсөтүлгөндөй, (37±0,5) ^{0}С инактиванттык концентрациясы 0,05 % жана 0,2 %де вирус 6-12 сааттан кийин инфекциялык, ошондой эле антигендик активдүүлүгүн жоготот. Инактиванттын концентрациясынын жүрүшүндө антигендик активдүүлүгүн максималдуу сакталышы менен 9 сааттын ичинде 0,1% ВБТнын инфекциялык активдүүлүктүн толук инактивацияланат.

Кийинки биз жүргүзгөн эксперимент изилдөөлөрдө рН реакциялык чөйрөдө терилген, жогорку инактивировандык ВБТны антигендик активдүүлүгү менен алуу жөнгө салынды. Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн жүрүшүндө сыналган (6,5-6,9; 7,0-7,4 и 7,5-8,0) рН маанилүү реакциялык чөйрөдө узагыраак инактивациялык процессинде рН (7,0-7,4) маанисинде аныкталган. Вирустун антигендик активдүүлүгү инактивацияланган убакыттын ичинде, алгачкы деңгээлде калган.

Жогорку келтирилген изилдөөнүн жыйынтыктарын анализдесек вирустук БЛ 0,1% концентрациясында (37±0,5) ^{0}С температурадагы 12 сааттын ичинде ВБТнын инфекциялык касиеттерин толук бузат - деп белгилесек болот, ушул эле учурда антигендик активдүүлүгүн сактап калат.

Вакцинаны даярдоо үчүн эффективдүү адьювантты тандоо. Адьювантты туура тандоодо вакцинанын эффективдүү иштөөсүндө маанилүү милдет болуп эсептелинет. Адьюванттарды тандоодогу максат жана алардын эффективдүүлүгүн өздөштүрүү үчүн биз жактан кийинки сыноолордо өткөрүлгөн: сапониндин (сорбировандуу вакцина) гидроокись алюминий менен жана жаңы майлуу Montanide™ISA-71VG адьюванты Seppic (эмульгирленген вакцина) француз фирмасы. Даярдалгандан кийин вакцинанын эки түрүн рН маанисине, илешкектүүлүгүнө, эмульсиялык туруктуулугуна өлчөгөнбүз. Реактогендүүлүктү өздөштүрүп жатканда эмделген жаныбарларга вакцинанын

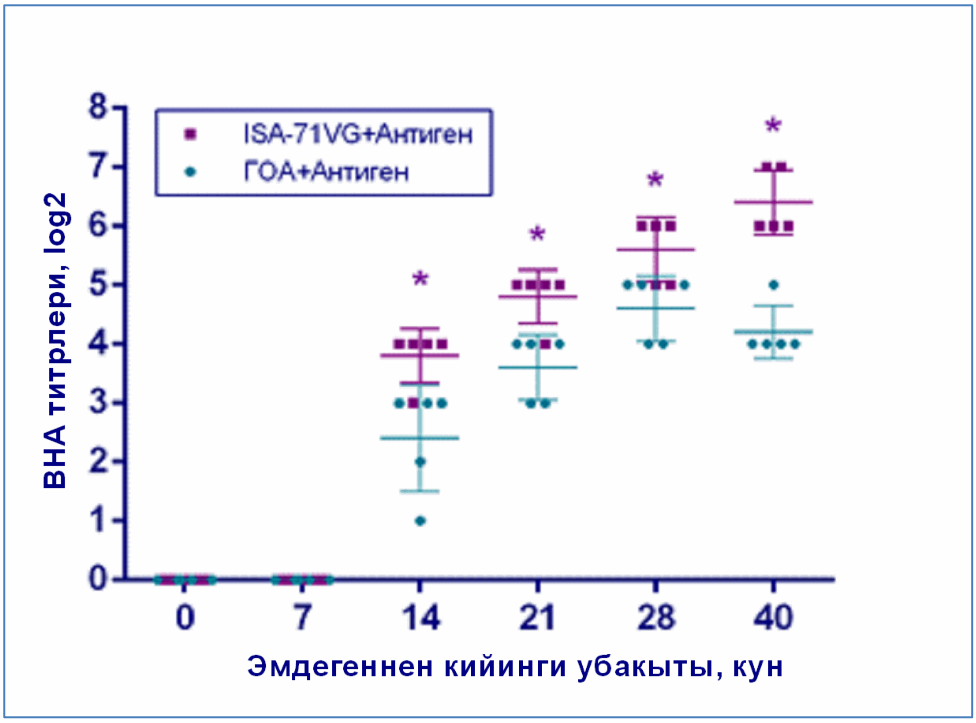
берилиши, жаныбарлардын жалпы абалы, анын ичинде жергиликтүү реакциясы эске алынган. ГОА 10 мг/мл сы бар вакцинаны бергенден кийин, эмделген жаныбарларга иньекция жасалган жеринде тыгыздалуу байкалган, алар акырындык менен таркап жана эмделгенден кийин 7-10 күндүн ичинде жоголуп кеткени байкалды. Ошондой эле бул группанын 90% жаныбарларында 2-3 күндүн ичинде 40,5 жана 40,6°С чейин безгек жана адъювант (гидроокись алюминий) менен берилген вакцинаны сайганы үчүн аксап калышкандыгы байкалган.



2 сүр. Эмульгирленген жана сорбировандык вакцина менен эмделген жаныбарлардын температурлык реакциялары.

Вакцинанын эмульгирленген реактогендүүлүгүн өздөштүрүп жатканда, булчуңдун ичине берилген 2 мл өлчөмдөгү иньекция кылган жеринде клиникалык өзгөрүүлөр байкалбаган, ошондой эле дененин табы физиологиялык норманын чегинде болгондугу аныкталган. Жаныбарларды көзөмөлдөө мезгилинде клиникалык акыбалы канааттандыраарлык болгон.

Кийинки тажрыйбаларда койго (n=5) эмульгирленген жана абсорбциялык вакцинаны иммуногендик даярдоосун өздөштүрдүк. ВНАнын вирустук БТга топтолгон динамикасынын жыйынтыгы 3 сүрөттө көрсөтүлгөн.



Антиденечилердин ортача титрлери ± SD боюнча келтирилген. Статистикалык анализ t-тест боюнча жүргүзүлгөн. * - *p<0.05*.

3 сүр. Эмделген жаныбарлардагы ВНА динамикалык түзүлүүсүн изилдөөнүн жыйынтыктары.

Өткөрүлгөн изилдөөнүн жыйынтыктарында ВНА эмделгенден соң койлордо 7 күндөн кийин чыкпаганы билинген, ал эми иммунизациялоодон кийин 14, 21, 28 жана 40 күндөрүндө ВНА 2,0 жана 7,0 $\log_2$ титрлеринде табылды. Бирок, иммунизациялоодон кийин 28 күндөрдө сорбировандык вакцина менен эмделген жаныбарларда бир аз ВНАнын төмөндөшү байкалган, орто эсеп менен 7,0 $\log_2$ чейин. Ошондуктан, БТка каршы инактивировандык вакцинаны даярдоо үчүн MontanideISA-71VG адьюванты эффективдүү болуп эсептелинет, анткени эмделген жаныбарларга бул адьювант терс таасирин тийгизбейт, сорбировандык вакциналарды жогорку титрларга салыштырганда вирусту нейтрализациялаштырууда антителолорунун өсүшүнө өбөлгө түзөт.

Өткөрүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгында иммуностимулдаштыруунун эффективдүүлүгүн өздөштүрүү натыйжасы менен реактогенндик тестирлөө адьювантын салыштырсак эң жакшы иммунобиологиялык көрсөтмөлөрдөн майлуу адьюванты Montanide™ISA-71VG оптималдуу жана жаңы вакциналардын составына кирген деп табылган.

Вакцинын минималдуу эмдөө дозасын аныктоо. Вакцинанын минималдуу эмдөөчү дозасын 50%тик иммунизациялоо вакцинанын дозасынын натыйжасында (ИмД$_{50}$) аныктадык. Аныктоонун жыйынтыгында 4 жана 16

вирустук БТ серотиптерине каршы болгон инактивациялык эмульгирленген вакцина (4 табл.) көрсөтүлгөн.

4 таблица – Вирустук БТга каршы бивеленттик инактивациялык эмульгирленген вакцина ИмД$_{50}$ аныктоо

Вакцинанын катыштары	Көзөмөлдүк козуларды жуктуруу			Антиденеченин титрлери РН, log_2		ИмД$_{50}$, мл
	тажрыйбада	Иммунд алган	Орточо группа боюнча, баллдардагы реакциялар	ВБТ 4	ВБТ 16	
1:2	6	6	0±0,00	1,7±0,43	1,8±0,21	0,041
1:4	6	6	0±0,0	1,5±0,18	1,6±0,22	
1:16	6	3	5±3,0	1,1±0,22	1,3±0,21	
1:32	6	2	12±3,2	-	-	
Плацебо (көзөмөл)	6	0	20±5,1	-	-	
Эскертүү: «-» РН антиденече табылган жок.						

4 таблицада көрсөтүлгөндөй, вакцинаны 1:2 ден 1:4 чейинки катышта ээритсе, бардык эмделген койлордо (n=6) РН чөйрөдө эки серотип үчүн 1,5±0,18 баштап 1,8±0,21 log_2 чейин титрлери менен иммундук реакция берген. Эмделген жанбарлардын жарымы 1:16 катыштагы ээритмесинде, жаныбарлардын организминде 4 жана 16 серотиптери үчүн 1,1±0,22 и 1,3±0,21 log_2 титринде антиденечелер болгондугу менен көзөмөлдүк жугузууда ооруп калышкан. Вакцина менен эмделген жаныбарлардын антиденечеоери 1:32 катыштагы ээритмесинде болбогон, бирок бул жаныбарлардын 33% көзөмөлдүк жугузууда абалы жакшы болгон жана ооруунун клиникалык белгилери кездешпеген, ошол эле убакта, көзөмөлдүк группа ооруп калган жана көзөмөлдүк жугузууга болгон реакциясы орто эсеп менен 20 баллды түзгөн.

Ошентип, вирустук БТга каршы ИмД$_{50}$ (0,041) вакцинасы 0.041 мл түзгөн. Вакцинанын протективдүүлүгү бөлүү жолу менен эсептелинген (0,1мл) вакцинанын манилүүлүгү 24,4 ПД$_{50}$ түзгөн.

Вирустук БТга каршы инактивациялык вакцинанын берилүүыкмасынын таасирдүлүгүн иммунизацияга болгон натыйжалуугун изилдөө. Бул үчүн жаныбарларды булчунга, теринин астына, ичине 1.0 мл эмдешкен. Берүлүүчү ыкмалардын таасирдүлүгүиммунизациядан кийинки 30 күндө баллдык шкала менен бааланган. Изилдөөнүн жыйынтыгында, 1.0 мл дозасында теринин астына бериле турган препарат 30 күндө бир жолу берилгенден кийин 50% эмделген койлордо pH 0,7±0,41log_2 титрдеги антиденечелерди иштеп чыккандыгы аныкталган. Ошондо эле, булчунга жана теринин астына эмдөө 100% тажрыйбага алынгандарда (1,8 ±

0,31) баштап (2,3 ± 0,33) log_2 чейин титрдеги эки серотип үчүн антиденечелерди иштеп чыккандыгы такталган (5 табл.).

5 таблица – Инактивациялык эмульгирленген биваленттик вакцинанын берилүү ыкмасынын блутанг вирусунун 4 жана 16 серотиптерине каршы иммунизациянын натыйжалуугуна болгон ыкманы киргизүүдөгү таасири.

Саюу ыкмалары	Титр ВНА, log_2		Көзөмөлдүк жуктурууларга болгон реакциялар			Вакцинациянын натыйжалуулугу, %
	ВБТ-4	ВБТ-16	Тажрыйбадагы койлордун саны / илдетке чалдыккандар	Баллдарды баалоо		
				макси-малдуу	Орточо группа боюнча	
БИ	2,3±0,33	2,1±0,31	4/0	0	0	100
ТИ	1,2±0,43	1,3±0,50	4/2	2	0,7	50
ПК	1,9±0,38	1,8±0,27	4/0	0	0,2	100
Көзөмөл	0,0	0,0	4/4	30	23	0
Эскертүү: БИ – булчундин ичине; ТИ – теринин ичине; ТА – тери астына; « - » - клиникалык белгилер байкалган жок; « + » - клиникалык белгилердин болушу						

ВНАнын титрин өздөштүрүү боюнча алынган жыйынтыктар 3 сыналган киргизүү ыкмаларынын арасында бирдей эмес гумаралдуу антиденечелердин динамикалык түзүлүшүн көргөзгөн. Бирок, математикалык иштеп чыгууда, сыноодон өткөрүлгөн киргизүү ыкмалары менен жыйынтыгынын айырмасы жок болуп чыккан. Ал эми сыналган инокуляцияланган ыкмаларынын ичинен булчуңга берүү башка ыкмаларга караганда таасирдүү болот.

Эмдөөнүн санын аныктоо жана иммуногендик касиеттерине вакцинаны берүү аралыгынын таасири. Экспериментти жүргүзүүнүн максаты менен эмулгировандык вакцинаны 1 же 2 жолу койлордун булчуңуна 1 мл берилген. Биринчи жолку ревакцинациядан кийин эки жолу иммунизациялодо, экинчисин 7, 14, 21 жана 28 күндө жүргүзүшкөн. Көзөмөлдүк биринчисинен кийин 60 күндө беришкен.Изилдөөнүн жыйынтыгы 6 таблицада көрсөтүлгөн.

6 таблицадагы берилген материалдар ревакцинация эмделген жаныбарлардын иммундук туруктуулугуна таасир бербегендигин көргөзөт. Вакцинанын бустердик дозасында берүү аралыгынын өзгөрүшү, ошондой эле вакцинациянын эффективдүүлүгүн чагылдырбайт. Эки жолу 7, 14, 21 жана 28 күндүк аралыгы менен эмделген койлорго окшоп, бир жолу эмделген койлор ошондой эле окшош серотип көзөмөлдүк жугузууда өзүнүн туруктуулугун билгизген. ВНАнын титри бир жана эки жолу койлордун сывороткасында ВБТнын эки серотиби үчүн көзөмөлдүк жугузуунун астында 2,1±0,11 баштап 3,5±0,43 log_2 чейин өзгөрүлгөн. Төмөндө айтылгандай ВБТга инактивировандуу

эмульгировандык биваленттүү вакцина бир жолу иммунизациялоодо 1 мл көлөмүндө койлордун 100% иммунитетинин түзүлүшүнө жетиштүү.

6 таблица – Инактивациялык вакцинаны берүүдөгү калдыксыздыкка жараша иммуногендүүлүктүн жыйынтыгы

Вакцинаны берүүнүн калдыксызды гы	Тажрыйбадагы койлордун саны	Вакцинация нын интервалда ры, күн	ВНА титрлери, $\log_2$		Көзөмөлдүк жуктурууларга болгон реакциялар (баллдар)	Вакцинациянын натыйжалуулугу, %
			ВБТ-4	ВБТ-16		
Бир жолку	6		2,1±0,11	2,3±0,13	0	100
Эки жолку	6	7	2,3±0,32	2,4±0,21	0	100
	6	14	2,3±0,19	2,4±0,17	0	100
	6	21	3,1±022	3,2±0,50	0	100
	6	28	3,2±0,43	3,5±0,10	0	100
Көзөмөлдөгү жаныбарлар	4				21	0

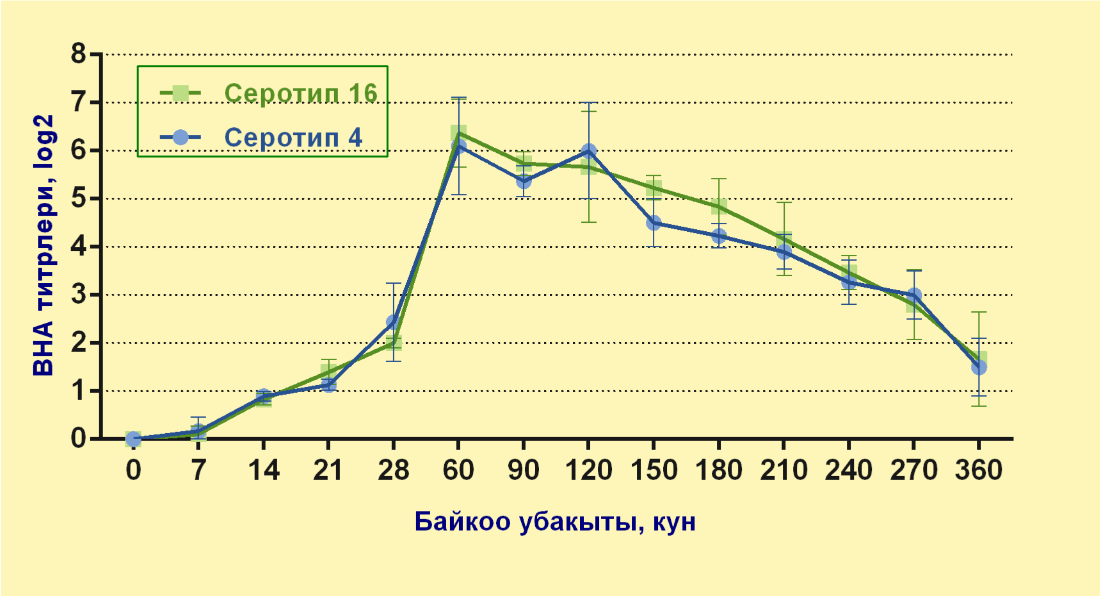
Эмделген койлордо пайда болгон иммунитеттин узактыгын жана башталган мөөнөтүн изилдөө. Иммунитеттин башталган мөөнөтүн аныктоо үчүн инактивациялык эмульгирленген биваленттүү вакцинаны ошол эле учурда 16 койго 1,0 мл өлчөмүндө булчуңга эмдеген. Көзөмөлдүк жугузуу эмделгенден кийин 7, 10 жана 14 күндөрүндө берилген. Ар бир белгиленген күндө 4 эмделген койго жугузушкан (7 табл.).

7 таблица – Вирустук БТга каршы инактивациялык вакцина менен эмделген койлордун иммунитетинин башталган мөөнөтүн аныктоо жыйынтыгы

Иммунизациядан кийин жугузуу мөөнөтү, күнү	Тажрыйбадагы койлордун саны	ВНА титрлери, $\log_2$		Көзөмөлдүк жугузууга болгон реакциялары		% протективдүүлүк
		ВБТ-4	ВБТ-16	Реакция берген койлордун саны	Көзөмөлдүк жугузуудагыс суммардык баллдар	
7	4	N	N	4	18	0
10	4	0,5±0,3	0,6±0,12	2	5	50
14	4	0,9±0,15	1,0±0,17	1	3	75
21	4	1,7±0,23	1,9±0,19	0	0	100
Көзөмөл	4			4	26	0
Эскертүү: «n» – организмдеги ВНА табылган жок						

7 таблицада берилген материалдар инактивациялык вакцина менен эмделген койлордо көрүнүктүү иммунитет эмделгенден кийин 10 күнү башталат. Ошондуктан, вакцинанын протективдүүлүгү 50% түзөт. Иммунизациялангандан кийин 14 күнү жаныбарлардын жарымынан көбү иммунитетке ээ болот, бул жерде вакцинанын протективдүүлүгү 75% түзөт. Вирустук БТга каршы инактивациялык эмульгирленген биваленттүү вакцина менен эмдөөсү убагына жетпесе иммунитет пайда болбойт.

Вирустук БТ 4 жана 16 серотиптерге инактивациялык эмульгирленген биваленттүү вакцина (ИЭБВ) менен эмделген жаныбарлардын иммунитетинин узактыгы. БТга каршы ИЭБВ менен эмделген жаныбарлардын иммунитетинин узактыгын аныкташ үчүн 1 мл өлчөмдө 48 баш койго 1 жолудан эмдөө жүргүзүшкөн. Жыйынтыгы 4 сүрөттө көрсөтүлгөн.



4 сүр. Вирустук БТ каршы инактивациялык вакцинанын эмделген койлордун организминдеги ВНА динамикасынын пайда болушу.

4 сүрөттө көргөзүлгөндөй вакцинаны бергенден кийин 7 күнү жаныбарлардын организминде 0,1-0,2 $\log_2$ титрлери ВНАга табылды. 0.83-0.9 $\log_2$ 4 жана 16 серотиптерге каршы антиденечелердин титрлеринин көбөйүшү 14 күндө байкалган. Алар өзүнүн максималдуу титрлерине (6.1-6.4 $\log_2$) эмдөөдөн кийин 60 күнү жеткен. 90 күнү анденечелердин титрлери 4.5-5.2 $\log_2$, чейин төмөндөшү байкалат, алар акырындык менен 1.8 -2.0$\log_2$ чейинки титрине иммунизацияланган күндөн кийин 360 күнү төмөндөйт. Ошондой эле ВНАнын өлчөмү ВБТнын эки серотибине тең койдун канынын сывороткасында айырма берген жок (Р $\geq$ 0,05).

Вирустун нейтрализациялоо жөндөмдүүлүгүнөн аныкталган эмделген койлордун канынан биз жактан резистенттелген вируленттик вирус менен көзөмөлдүк жугузууда тажрыйба өткөрүлгөн, алар эмделгенден кийин 90, 180, 270 жана 360 күндө берилген. Ар бир көрсөтүлгөн мөөнөттө эмделгендер менен катар жана башка 4 интакттуу койлорго жугузулган. Тажрыбага алынган жаныбарларга 10 мл (10^3 $ИД_{50}$/мл) көлөмүндө патогендик вирустун гомологендүү штаммдарын тамырдын ичине бергенбиз. Көзөмөлдүк жугузуунун реакциясын баллдык шкала менен эске алынган. Өткөрүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгында, БТга каршы иштелип чыккан вакцина көзөмөлдүк жугузуу тажрыйбаларында эмделгенден кийин 360 күндүн ичинде эмделген жаныбарларга коргоо камсыздаганын аныктаганбыз. Эмделбеген, көзөмөлдүк койлордо жугузуудан кийин, БТга мүнөздөлгөн ооруунун белгилери пайда болгон. Ошондой эле вирустук БТнын эпизоотиялык штаммдарын бергенден кийин реакциясы иммунизацияланган көзөмөлдүк жаныбарларда орто эсеп менен группада (0±0,00) и (27±4,5) баллды берген. Эмделген жана көзөмөлдүк группалардын баллынын айырмасы (27 балл). Вакцинанын жогорку иммуногендик тестирлөөсү жөнүндө тастыктайт.

Ошентип, жүргүзүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгы бул вакцина БТга каршы чыңалган иммунитеттин пайда болуусун камсыздайт, ал эмделгенден кийин 10 күндө пайда болот жана 360 күндөн аз узартылбайт.

Вакцинанын иммуногендик касиеттерин эчкилерде жана ИМЖда өздөштүрүү. Бардыгыбызга белгилүү болгондой негизги вирустук БТнын резервуары эчкилер жана ИМЖлар болот. Жаныбарлардын бул түрлөрү чагуучу кан соргуч чымындар үчүн койлорго салыштырмалуу азыктандыруучу катары жагымдуу. Ошондуктан берилген жаныбарлардын түрлөрү, тез кабыл алган жаныбарлардын башкы звоносу катары каралат. Буга байланыштуу эпизотияга жүргүзүлгөн иш-чараларды БТга каршы массалык ИМЖ менен эчкилерди иммунизациялоо жүргүзүлөт.

Жогоруда айтылгандай, биздин тажрыйбада ИМЖга 2 мл өлчөмдөгү иштелип чыккан иммуногендигин өздөштүргөнбүз. Иммунизациялангандан кийин ИМЖнын сывороткасында антиденечелер пайда боло баштайт, максималдуулугу 60чы күнү жетет, эки серотип үчүн титр 3,0 жана 3,1 $\log_2$ чегинде болгон. Андан кийин ВНА жаныбарларында эмделгенден кийин 4 жана 16чы серотиптери үчүн 360чы күнү 1,5 и 1,6 $\log_2$ чейин титрлердин азайышы байкалат.

Вакцинаны коргоо эффективдүүлүгүнүн узактыгын вируленттик вирус менен көзөмөлдүк жугузуу жолу менен аныкташкан. Аны иммунизациялангандан кийин 6 жана 12 айда беришкен. Бул тажрыйбалардын жалпыланган жыйынтыгы 8 таблицада көрсөтүлгөн.

8 таблица – БТга жана ИМЖга каршы вакцинанын иммунитетинин узактыгын аныктоо жыйынтыгы

Иммунизациядан кийинки жугузуу мөөнөтү, айы	Тажрыйбадагы жаныбарлардын саны	Көзөмөлдүк жугузууга болгон реакциялары		% протективдүүлүк
		Реакция берген жаныбарлардын саны	Баллдарды баалоо	
6	4	0	0	100
12	4	0	0	100
Көзөмөлдүк жугузуу	4	4	16	0

8 таблицада көрсөтүлгөндөй, БТга каршы ИЭБВ менен эмделген кийин жаныбарларда көзөмөлдүк жугузуу тажрыйбасында 12 айдын ичинде организмди коргоо камсыздалат. Эмделген торпоктордо, эмдөөдөн кийин белгиленген мөөнөттө жугузууда, ооруунун белгилери байкалган эмес, ошол эле убакта көзөмөлдүк жаныбарларда жугузуудан кийин ооруунун белгилери байкалган, БТга мүнөздүк жана көзөмөлдүк жугузууга болгон реакциясы 16,0 баллды түзгөн.

Жогоруда айтылгандын негизинде, эмделген ИМЖнын иммунитетинин узактыгы 2,0 $см^3$ өлчөмүндө 12 айды түзгөн деп далилдесек болот.

Кийинки тажрыйбалардын серияларында эмделген эчкилердеги антиденечелердин топтолуу динамикасын өздөштүргөнбүз. Анын жыйынтыгында эмделгендердин сывороткасында антиденечелер иммунизациялангандан кийин 7 күнү пайда болот, 1,5-2 айда (6.0-6.3 log2) максималдуу титрине жетип жана ушул титрлерде 4 айга чейин сакталат, андан кийин кандагы антиденечелердин титрлеринин азайгандыгы байкалат. Вакцинанын эффективдүүлүгү 3, 6 жана 9 айда көзөмөлдүк жугузуудан кийин вирустук БТ вируленттик штаммдардан 100% коргоону көргөзгөн.

Жогоруда айтылгандардын негизинде 1,0 $см^3$ өлчөмүндө миңдеген эмделген эчкилердин имунитетинин узактыгы 12 айды түзгөн.

Ошондуктан, изилдөөнүн жыйынтыгы биз иштеп чыккан ИЭБВны даярдоо технологиясында жакшы иммуноген бар деп көрсөтүп, кийинки тажрыйбаларда препаратты узак сактоо иммуногендик касиеттерин өздөштүрүүгө максат койгонбуз.

Вакцинанын жарактуулугун аныкташ үчүн табигый абалында аны 5, 10,20 күндүн ичинде (20±2)°С, (37±1)°С температурасында, 6 жана 12 айдын ичинде (2-8) °С сактаган. Жыйынтыгында 5-20 күнгө чейин (20±2) °С, (37±1) °С сактоо температурасында жана 12 айдын ичинде (2-8) °С иммуногендик касеттери сакталып жана эмделген жаныбарлар туруктуу иммунитеттин түзүлүшүн чакырат, ал көзөмөлдүк жугузууга туруктуулук берет деп аныкталды.

Өткөрүлгөн изилдөөнүн жыйынтыгын жалпылоодо БТга каршы вакцинанын иммуногендиги (2-8) °С 12 айга чейин сакталат жана ошону менен ЭЭБди транспортировкалоодо жана сактоодо көрсөтүлгөн талабына жооп берет.

БТга каршы инактивациялык вакцинанын иммуногендигин жана коопсуздугун текшериш үчүн институттун ичинде комиссиялык сыноо өткөрүлгөн, ал сыноо изилдөөнүн жыйынтыгын толук тастыкталгандыгын аныктады (2011-жылдын 6-апрелиндеги Биологиялык коопсуздуктардын көйгөйлөрү илим-изилдөө институтунун ген. директорунун №139/09-06 буйругу, 2011-жылдын 6-апрелинен баштап 2011-жылдын 30-сентябрына чкйинки мезгилдер).

БТга каршы ИЭБВнын даярдоо технологиясы көрсөтүлгөн нормативдүү-техникалык иш кагаздарынын талабына ылайык келет.

ТЫЯНАКТАР

1. Казакстандын түштүк аймактарында блутанг боюнча эпидемиологиялык жагдай өздөштүрүлүп аныкталды. Ошондой эле блутангдын вирустарынын антителолорунун жалпы изилденген пробаларынын ичинен оң ММЖ пробасында 11,85% жана ИМЖ пробасында 14.21% көрсөтүп, ушул региондордогу блутанг вирустарынын циркуляциясы аныкталды.

2. Вирустук блутангдын суспензиялык өөрчүшүнүн шарты өнүктүрүлгөн ВНК-21 өөрчүгөн клеткасы менен алардын төмөндөгү параметрлери аныкталган: жуктуруу өлчөмү 0,1ден 0,2 чейин $ТЦ_{Д50}$/кл, колдоочу азыктандыруучу чөйрөдө ИММдын канындагы сыворотка - 5% болот, 37 °С температурада инкубациялоо 120 сааттын ичинде ишке ашырылат. Жогорудагы параметрлерди сактоо менен антигендик активдүүлүктү (1:16) жана жогорку биологиялык вирусту кармаган суспензияны (6,50÷6,75 $lgТЦД_{50}$/мл төмөн эмес) алууга мүмкүндук болду.

3. Концентрациянын акыркы реакциялык чөйрөсүндөгү 12 сааттын ичинде 37 °С с рН 7,0-7,4 температурасында антигендик касиеттерин жоготпой, 0,1% чейин вирустун бета-пропиолактон менен инактивация режиминин жакшыруусу аныкталды.

4. Иммуногендик активдүүлүгүктөгү төмөнкү жана орточо жабышкак инактивировандуу бивалентүү вакцинанын курамындагы майлуу Montanide™ ISA-71VG адъюванты тандалып, инактивировандуу вакцинанын адъюванттуу өнүктүрүлгөн курамы такталды.

5. Montanide™ ISA-71VG адъюванты менен вакцинаны 1,0 мл (ММЖ үчүн) же 2,0 мл (ИМЖ үчүн) өлчөмүндө бир жолку булчуңга берип иммунизациялоодо, жаныбарларда узактыгы 12 айдан кем эмес болгон (байкоо мөөнөтү) иммунитет пайда болгондугу аныкталды.

6. Температуранын түрдүү режиминдеги вакцинанын жарактуу мөөнөтү жана туруктуулугу өздөштүрүлдү. БТга каршы иштелип чыккан биваленттик эмульгирленген вакцина өзүнүн иммуногендик касиеттери жана туруктуулугу (2-8) ^{0}С 12 айга чейин сакталат.

7. Комиссиялык технологиялык сыноонун жыйынтыгында БТга каршы инактивацияланган биваленттик эмульгирленген вакцинаны даярдоодо Акт жана протокол түзүлгөн. Нормативдүү-техникалык иш кагаздары иштелип чыкты.

ПРАКТИКАЛЫК СУНУШТАР

Өндүрүшкө иштелип чыккан вакцинаны киргизүү үчүн шартталып өздөштүрүлгөн тартиптеги нормативдик-техникалык иш кагаздарынын комплектинин иштелип чыгышына жана тастыкталышына төмөндөгүлөр:

- вакцина үчүн стандарттар (СТ 405-1919-04 ГП-070-2011);
- БТга каршы инактивацияланган биваленттик эмульгирленген вакцинаны көзөмөлдөөдөгү жана даярдоодогу убактылуу нускамасы (койлордун катаралдык безгеги);
- БТга каршы инактивацияланган биваленттик эмульгирленген вакцинаны пайдалануу боюнча убактылуу нускамасы (койлордун катаралдык безгеги) кирет.

ДИССЕРТАЦИЯНЫН ТЕМАСЫ БОЮНЧА ИЛИМИЙ ЭМГЕКТЕРДИН ТИЗМЕСИ

1. Пат. 22259 Казахстан, 2008/1213.1 Способ приготовления вакцины против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, К.Д. Кулманбетов, Д.С. Таранов, **К.Д. Жугунисов,** Б.Хайруллин; Опубликован 06.11.2008г.

2. Пат. 22285 Казахстан, 2008/1212.1 Способ суспензионного культивирования вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, К.Д. Кулманбетов, Д.С. Таранов, **К.Д. Жугунисов,** Ж.Ж. Саметова, Н.Б. Кипшакбаева; Опубликован 06.11.2008г.

3. Пат. 24882 Казахстан, 2010/1402.1 Способ культивирования вируса катаральной лихорадки овец роллерным методом [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, **К.Д. Жугунисов,** Ж.К.Кошеметов, С.Ш. Нурабаев, А.Ж. Ажибаев; Опубликован 15.11.2010 г.

4. **Жугунисов, К.Д.** Приготовление культурального антигена вируса блютанга для непрямого варианта иммуноферментого анализа [Текст] / А.Ж. Ажибаев, Кошеметов Ж.К., Мамадалиев С.М., Нурабаев С.Ш., Матвеева В.М., Бурабаев А.А., Абдураимов Е.О., **Жугунисов К.Д.** // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. С.-Петербург, 2011. №1. – С. 28-33.

5. Пат. 26354 Казахстан, 2011/0685.1 Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, К.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, **К.Д. Жугунисов**; Опубликован 21.06.2011г.

6. Пат. 26355 Казахстан, 2011/0782.1 Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной моновалентной против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, К.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, **К.Д. Жугунисов**; Опубликован 11.07.2011г.

7. **Жугунисов, К.Д.** Сравнительное изучение методов культивирования штамма «Хуросон-07/4» вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Ж.Т. Аманова, Е.О. З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Е.А. Булатов Е.О. Абдураимов // Известия ВУЗов Кыргызстана 2014. №5. – С.118-119.

8. **Жугунисов, К.Д.** Получение вируса блутанга в культурах клеток внк-21/17 и el-4 суспензионным методом [Текст] / Жугунисов, К.Д. Жунушов А.Т., Ершебулов З.Д., Таранов Д.С., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А., Абдураимов Е.О.// Известия НАН КР, 2017, №1, с.17-21

9. **Жугунисов, К.Д.** Совершенствование режима инактивации вируса блутанга бета-пропиолактоном [Текст] / Жугунисов, К.Д. Жунушов А.Т. // Известия НАН КР, 2017, №2, с.35-40

10. **Жугунисов, К.Д.** Сравнительная оценка эффективности различных адъювантов при изготовлении инактивированной вакцины против блутанга [Текст] / Жугунисов, К.Д. Жунушов А.Т., Ершебулов З.Д., Таранов Д.С., Абдураимов Е.О.// Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017. Т. 35. № 3. С. 31-37.

11. **Zhugunissov, K.** Beta-propiolactone inactivated bivalent bluetongue virus vaccine containing Montanide ISA-71VG adjuvant induces long-term immune response in sheep against serotypes 4 and 16 even after 3 years of controlled vaccine storage [Текст] / K. Zhugunissov, Ye. Bulatov, D. Taranov, Z. Yershebulov, Zh. Koshemetov, A. Zhunushov, G.J. Renukaradhya, K. Tabynov, Ye. Abduraimov // Veterinary Microbiology 226 (2018) 23–30 (Thompson Reuters - IF-2.524).

Жугунисов Куандык Даулетбаевичтин «Блутанг ылаңынын профилактикалык каражаттары жана ага каршы вакцина даярдоо технологиясын жакшыртуу» деген темада 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын алуу үчүн жазылган диссертациясынын кыскача

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: блутанг, технология, профилактика, штамм, инактивацияланган вакцина, иммуногендүүлүк.

Изилдөөнүн объектиси: блутанг ылаңынын вирусу, инактивацияланган вакцина, бодо жана майда мал

Изилдөөнүн предмети: блутанг ыланынын вирусы культуралдык касиеттери, адъюванттардун иммуностимулдук эффекдүүлүгү жана вакцинанын иммуногендик активдүүлүгү.

Иштин максаты. Блутанг ылаңына каршы инактивацияланган вакцинаны даярдоо технологиясын жакшыртуу жана анын иммунобиологиялык касиетин бодо мал менен майда малды изилдөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: биотехнологиялык, вирусологиялык, серологиялык, иммунологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы. Казахстандын түштүк областарындагы жаныбарларды инфекцияны эрте аныктоо үчүн серомониторинг жүргүзүлдү.

ВНК-21/17 жана El-4 клетка культураларынын суспензиялык адисинин технологиялык жана вирустун репродукциялык сапаттамалары аныкталды.

Блутанг ылаңынын вирусун бета-пропиолактон менен инактивациялоонун оптималдуу жаны режими аныкталып, антигендик активдүүлүгү максималдуу сакталган инактивацияланган вирус алынды.

Казахстанда биринчи жолу блутанг ылаңынын вирусунун 4-чү жана 16-чы серотиптерине каршы инактивацияланган эмульгирленген вакцинасын Montanide™ ISA-71VG жаңы коммерциялык майлуу адъювантты колдонуу менен иштелип чыкты. Вакцинанын иммунобиологиялык касиеттери бодо жана майда малдарда изилденди жана анын протективтик эффективдүүлүгүнө баа берилди.

Блутанг ылаңынын вирусунун 4-чү жана 16-чы серотиптерине каршы инактивацияланган эмульгирленген вакцинасы Montanide™ ISA-71VG жаны коммерциялык майлуу адъюванты менен бирге 1,0 мл (майда малга) же 2,0 мл (бодо малга) дозадан бир жолу иммунизацияланганда жаныбарларда 10-чу күндөн баштап 12 айга чейинки иммунитет пайда болот.

Колдонулуучу чөйрө: биотехнология, вирусология, ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации Жугунисова Куандык Даулетбаевича на тему: «Совершенствование средств профилактики и технологии изготовления вакцины против блутанга» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология

Ключевые слова: блутанг, технология, профилактика, инактивированная вакцина, иммуногенность.

Объект исследования: вирус блутанга, мелкий и крупный рогатый скот, инактивированная вакцина.

Предмет исследования: Культуральные свойства вируса блутанга, иммуностимулирующие эффективности адъювантов и иммуногенная активность вакцины.

Цель работы: Совершенствование технологии приготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против блутанга КРС и МРС и изучение ее иммунобиологических свойств..

Методы исследования: биотехнологический, вирусологический, серологический, иммунологический

Полученные результаты и их новизна: Впервые в южном регионе Казахстана проведен серомониторинг с полным охватом сельскохозяйственных животных для раннего выявления инфекции и быстрого реагирования.

Определены вирусрепродуцирующие и технологические характеристики перевиваемых клеточных культур ВНК-21/17 и El-4 суспензионным методом.

В результате проведенных экспериментов подобраны оптимальные параметры инактивации вируса блутанга с применением БПЛ, максимально сохраняющие его антигенную активность.

Впервые в Казахстане разработана технология изготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против блутанга 4-го и 16-го серотипов с использованием новым коммерческим масляным адъювантом Montanide™ ISA-71VG, изучены ее иммунобиологические свойства в опытах на КРС и МРС, а также дана оценка ее протективной эффективности.

Инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина с новым коммерческим масляным адъювантом Montanide™ ISA-71VG в дозе 1,0 мл (для МРС) или 2,0 мл (для КРС) при однократном внутримышечном иммунизации создает иммунитет у животных на 10 сут после вакцинации, который длится не менее 12 мес (срока наблюдения).

Область применения: биотехнология, вирусология, ветеринарная практика.

SUMMARY

Dissertation of the Zhugunissov Kuandyk on the title: "Improving the prevention means and technology for manufacturing the bluetongue vaccine" for the degree of candidate of biological sciences in specialty 03.01.06 - Biotechnology

Key words: bluetongue, technology, prevention, inactivated vaccine, immunity

Object of the study: bluetongue virus, small ruminants and cattle, inactivated vaccine.

Object of the research: The cultural properties of the bluetongue virus, immunostimulating efficacy of adjuvants and immunogenic activity of the vaccine.

Objective: Improving the technology of preparation of inactivated emulsified bivalent bluetongue vaccine for cattle and small ruminants and studying its immunobiological properties.

Research methods: biotechnological, virological, serological, and immunological.

The obtained results and their novelty: For the first time in the southern region of Kazakhstan seromonitoring was carried out with full coverage of farm animals for early detection of infection and rapid response.

The virus-producing and technological characteristics of transplantable BHK-21/17 and El-4 cell cultures were determined by the suspension method.

As a result of the experiments, optimal parameters for inactivation of the bluetongue virus with the use of BPL, maximally preserving its antigenic activity, were selected.

For the first time in Kazakhstan, a technology was developed for manufacturing a inactivated emulsified bivalent bluetongue vaccine using the new commercial oil adjuvant Montanide ™ ISA-71VG, its immunobiological properties and protective effectiveness were studied on cattle and small ruminants experiments.

The inactivated emulsified bivalent vaccine with the new commercial oil adjuvant Montanide ™ ISA-71VG at a dose of 1.0 ml (for small ruminants) or 2.0 ml (for cattle) with a single intramuscular immunization creates immunity in animals 10 days after vaccination, which does not last less than 12 months (observation period).

Applications: biotechnology, virology, veterinary practice.

«Соф Басмасы» ЖЧКсында басылган
720020, Бишкек ш., Ахунбаев көч., 92.
Тиражы - 50 нуска.