

2022-15

Закон

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ИНСТИТУТ ГОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Диссертационный совет Д 03.20.607

На правах рукописи  
УДК 578.824.11:615.371:57.083.2

**ЕРШЕБУЛОВ ЗАКИР ДЖАПАРОВИЧ**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ  
АНТИРАБИЧЕСКОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДИКИХ  
ПЛОТЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ**

03.01.06 – биотехнология

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Бишкек – 2021**

Работа выполнена в Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики лаборатории биотехнологии и питания.

**Научный руководитель:** Жунушов Асанкадыр Темирбекович  
академик НАН КР, доктор ветеринарных наук, профессор, директор Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики

**Официальные оппоненты:** Гринь Светлана Анатольевна  
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора Федерального Государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Керимжанова Бахытжан Фазылжановна  
доктор ветеринарных наук, профессор, академик КазАСХН, заместитель руководителя отделения международных связей Алматинского научного центра противинфекционных препаратов

**Ведущая организация:** Институт проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук, Национальный центр коллекции патогенных микроорганизмов и лаборатория бактериологии (734067, г. Душанбе, ул. Гипрозем, 61)

Защита диссертации состоится «28» января 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 03.20.607 по защите диссертаций на соискание ученой степени (доктора) кандидата биологических наук при Институте биотехнологии НАН Кыргызской Республики и Институте горной физиологии и медицины НАН Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а, 303 ауд. Ссылка доступа к видеоконференции: <https://vc.vak.kg/b/032-yxz-w9w-pbe>.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках Института биотехнологии НАН Кыргызской Республики (720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а), Института горной физиологии, медицины НАН Кыргызской Республики (720048, г. Бишкек, ул. Анкара, 1/5) и на сайте [vak.kg](http://vak.kg).

Автореферат разослан 28 декабря 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор,  
член корреспондент НАН КР

Б.М. Худайбергенова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертации.** Бешенство является зоонозной болезнью, вызываемой вирусом, и передающейся от животных к людям. Болезнь возникает в случае инфицирования домашних и диких животных. Человек может заразиться в результате тесного контакта с инфицированной жидкостью, обычно слюной, при укусах или царапинах. По оценке ВОЗ это заболевание входит в пятерку зооантропонозов, наносящих наибольший экономический ущерб. Ежегодно в мире погибает от бешенства около 59 тысяч людей, из которых 35 172 - в Азии. Сложная эпидемиологическая и эпизоотическая ситуация по бешенству наблюдается в более, чем 110 странах мира, но более 95 % случаев смертности происходит в Азии и Африке.

В мире на современном этапе наблюдается рост рабической инфекции, такая же закономерность отмечается и в Казахстане, число случаев бешенства, регистрируемых у животных (лисица, енотовидная собака, волки, кошки и крупный рогатый скот), имеет тенденцию к росту со средним темпом 7% ежегодно. В республике Казахстан от бешенства гибнет до 700 голов сельскохозяйственных животных, из них ежегодно более 50% приходится на крупный рогатый скот, до 25% - на мелкий рогатый скот. (Жолшоринов А. Ж. и др., 2004)

По данным Рослякова А. А., Коломакина Г. А., Квасова И. Л., Турсункулова Ш. Н. (1995, 2008) резервуаром и главным источником бешенства на территории Казахстана и Кыргызстана являются дикие плотоядные животные, в первую очередь, лисицы и корсаки. Являясь основным вектором распространения заболевания, они непосредственно или через собак и кошек могут заражать бешенством домашних продуктивных животных и человека.

Международный опыт свидетельствует о невозможности искоренения заболевания без ликвидации очагов этой инфекции в популяциях лис и других диких плотоядных животных. Цикличность бешенства сельскохозяйственных животных напрямую связана с численностью популяций диких плотоядных (лисиц, корсаков и др.).

Наряду со снижением численности популяций до уровня, препятствующего распространению бешенства и обеспечивающего сохранение вида, все большее внимание, привлекает вакцинопрофилактика бешенства среди диких животных, предусматривающая естественный путь введения препарата, то есть посредством поедания животными различных приманок с вакциной.

Для борьбы с бешенством в дикой природе, разработаны и успешно применяются оральные антирабические вакцины. Отсутствие отечественных

разработок технологии производства пероральных вакцин против бешенства, а также высокая стоимость импортных вакцин задерживают внедрение этого эффективного метода борьбы с бешенством диких плотоядных и искоренение гидрофобии на территории Казахстана и Кыргызстана.

Вышеуказанные проблемы весьма актуальны и являются основой для проведения работ по созданию, масштабированию и испытанию культуральной антирабической вакцины для орального применения для диких плотоядных животных.

Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями. Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта на тему: «Мониторинг и изучение дикой фауны в эпидемически актуальных регионах на носительство опасных патогенов и разработка комплексных профилактических мероприятий для обеспечения биологической безопасности Республики Казахстан» (№ 0153/ПЦФ-14-ОТ) по целевому финансированию на 2013-2015 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, а также по теме «Коммерциализация вакцины инактивированной против бешенства животных» на 2018-2020 гг. по программе: «Ветеринарная безопасность территории республики Казахстан: эпизоотологический мониторинг, испытание, внедрение и коммерциализация средств специфической профилактики и диагностики особо опасных инфекционных заболеваний» (№ О.0878 ИПК BR06249226).

**Цель исследования:** основная цель работы заключалась в совершенствовании технологии изготовления и испытание антирабической вакцины для профилактики бешенства среди диких плотоядных животных.

**Задачи исследования:**

1. Приготовить различные питательные среды для проведения экспериментов.
2. Отработать оптимальные параметры суспензионного культивирования клеток и вируса бешенства.
3. Проверить воспроизводимость вируса при крупномасштабном культивировании.
4. Подобрать оптимальный состав приманки для пероральной вакцинации диких животных.
5. Изучить безопасность вакцинного штамма вируса бешенства при различных методах введения.
6. Изучить иммуногенные свойства вакцинного штамма вируса бешенств.
7. Провести оценку эффективности и безопасности пероральной вакцины на диких плотоядных животных.

**Научная новизна работы.** Подобрана оптимальная поддерживающая среда для культуры клеток ВНК-21с13. Отработаны оптимальные параметры суспензионного культивирования клеток и вируса бешенства.

Определена воспроизводимость вируса при крупномасштабном культивировании. Подобран оптимальный состав приманки для пероральной вакцинации диких животных. Изучена безопасность вакцинного штамма вируса бешенства при различных методах введения. Изучены иммуногенные свойства вакцинного штамма вируса бешенства.

Проведена оценка эффективности и безопасности пероральной вакцины на диких плотоядных животных.

**Практическая значимость полученных результатов.** Отработанная технология приготовления вакцины против бешенства диких плотоядных животных будет рекомендована к применению при производстве антирабической вакцины в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности Комитета Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

По результатам проведенных исследовательских работ получено авторское свидетельство Республики Казахстан №101894 на «Способ изготовления вакцины пероральной антирабической против бешенства диких плотоядных животных»;

– получено авторское свидетельство Республики Казахстан №99704 на «Способ изготовления вакцины культуральной антирабической инактивированной для профилактики бешенства животных»;

– разработана вакцина инактивированная против бешенства животных [СТ 405-1919-04 ГП-127-2020], инструкция по изготовлению и контролю, наставление по применению], утверждённые генеральным директором Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Комитета Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан и согласованные с Комитетом ветеринарного надзора и контроля Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Результаты работы могут использоваться в коммерциализации вакцинного препарата для профилактики бешенства среди диких плотоядных животных, что позволит отказаться от импортных зачастую дорогостоящих аналогичных пероральных вакцин против бешенства.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Оптимизация параметров суспензионного культивирования штамма VRC-RZ2 вируса бешенства в культуре клеток ВНК-21с13.
2. Воспроизводимость вируса при крупномасштабном культивировании.
3. Оптимальный состав приманки для пероральной вакцинации диких животных.

4. Технология получения антирабической вакцины из штамма VRC-RZ2 для пероральной иммунизации животных.

5. Иммунобиологические свойства культурального вакцинного штамма VRC-RZ2 вируса бешенства.

6. Безопасность вакцинного штамма вируса бешенства при различных методах введения.

7. Оценка эффективности и безопасности пероральной вакцины для диких плотоядных животных.

**Личный вклад соискателя.** Все разделы диссертационной работы выполнены автором самостоятельно. Отдельные этапы работ проведены совместно с научным сотрудником Далбаевым Н. К., магистром биологии Тараповым Д. С., и кандидатом биологических наук Жилиным Е. С., за что автор выражает им искреннюю признательность.

**Апробация результатов исследований.** Результаты исследований доложены на научных конференциях: II-я Международная научная конференция молодых ученых, посвященная дню образования научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Комитета Науки Министерства образования и науки Республика Казахстан «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности», (Гвардейский, 2014).

**Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.** По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 1 статья в журнале, рецензируемом Thomson Reuters, 3 статьи в журналах, входящих в РИНЦ, 3 в сборниках трудов международных конференций, получено 2 патента на изобретение и разработана научно-техническая документация по применению культуральной пероральной вакцины против бешенства животных.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 171 страницах компьютерного набора и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические предложения, приложения. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 20 рисунками. Список использованной литературы включает 238 наименований из них 124 на иностранном языке. В приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность полученных результатов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, необходимость проведения работ по созданию, масштабированию и испытанию культуральной антирабической вакцины для орального применения для диких плотоядных животных.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается краткая историческая справка болезни, характеристика биологических свойств возбудителя бешенства, результаты анализа эпизоотической ситуации по заболеванию в Кыргызстане и Казахстане, а также сопредельных государствах. Приведена характеристика способов адаптации вируса бешенства к репродукции в культурах клеток, характеристика пероральных антирабических вакцин и технологий их изготовления, а также методов диагностики, контроля качества и оценки эффективности препаратов.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследований и методических подходов к выполнению исследований. Работа выполнялась в лабораториях технологий культивирования вирусов и технологии готовых форм биопрепаратов РГП НИИПББ КН МОН РК (см.стр.5-6) в период 2013-2020 гг.

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

**Предмет исследования:** антирабическая вакцина.

В работе использовались штаммы вируса бешенства: «VRC-RZ2» и референс-штамм «CVS». Культуры клеток: первично-трипсицинизированная-ПЯ, перевиваемые - ВНК-21/с13, ПС, МДБК, Vero, ПЩ.

Биологические свойства штамма и опытные образцы вакцины испытывались на лабораторных белых мышах, кроликах, овцах, беспородных собаках разного возраста, лисах и волках.

**Методы исследования и аппаратура.**

**Культивирование вируса в культуре клеток.** Культивирование вируса проводили в стационарном, роллерном и суспензионном методом культивирования клеток ВНК-21/с13, ПС. Биологическую активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток (ВНК-21) и на новорожденных мышцах. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча, выражали в тканевых цитопатических дозах  $ТЦД_{50}/см^3$  и мышечных летальных дозах  $МЛД_{50}/см^3$ . Метод определения безвредности вакцины заключался в скармливании 10-кратной дозы животным. Вакцину считали безвредной, если животные выживали и не проявляли никаких признаков заболевания. Иммуногенность вакцины оценивали по способности индуцировать выработку вируснейтрализующих антител и защите животных при контрольном заражении штаммом «CVS» вируса бешенства.

**Метод определения титра вируснейтрализующих антител в сыворотке крови** основан на нейтрализации постоянной дозы вируса штамма CVS (30-300  $МЛД_{50}$ ) рядом последовательных разведений исследуемой сыворотки. Двукратные разведения сыворотки смешивали с равным объемом вируса штамма CVS. Полученную смесь инкубировали при температуре  $37^{\circ}C$  в

течение 1,5 ч и вводили интрацеребрально мышам. Подсчет титра вируснейтрализующих антител проводили по методу Рида и Менча.

Гематологические и биохимические исследования крови домашних и диких животных после вакцинации проводили с использованием T-540 счетчика Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) и ADVIA 120 Гематология System (Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, NY, USA) автоматического анализатора крови. Были определены следующие параметры: концентрация гемоглобина, гематокрит, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, сегментированные нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты и моноциты. Биохимические исследования образцов сыворотки проводили на автоматическом анализаторе VITALAB SELECTRA 2 (Merck, Германия) с использованием коммерческих наборов из DIASYS Diagnostic Systems GmbH (Германия); были определены следующие параметры: общий белок, общий билирубин, альбумин, глюкоза, холестерин, креатинин, аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы.

Для заражения животных использовали надсадки мозговых и культуральных суспензий вируса. Мышей заражали интрацеребрально. При оценке результатов учитывали проявление клинических признаков у зараженных мышей.

Статистическая обработка результатов исследований. Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием программы Microsoft Excel и GraphPad Prism 8.0.1.244. Разницу средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований и их обсуждение» представлены результаты приготовления различных питательных сред для проведения экспериментов. Для работ по культивированию клеток и вируса бешенства были приготовлены различные синтетические питательные среды. Состав питательных сред варьировал в зависимости от типа клеток. Для культивирования клеток учитывалось функциональное назначение среды, а также о потребности клеток, выращиваемых в искусственных условиях. Приготовленные питательные среды использовались для проведения научных работ по культивированию клеток в стационарных условиях и наработке культур клеток в суспензионных условиях.

3.2. Культивирование культур клеток в суспензионных условиях. В соответствии с паспортными характеристиками культура клеток ВНК-21 культивируется в стационарных условиях. Посевная концентрация при стационарном культивировании  $150 \pm 10$  тыс. клеток/мл. Клеточный монослой образуется на 2-4 сутки. В НИИПББ данная культура клеток была адаптирована к культивированию в среде ПСП с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Работу по адаптивированию линий клеток к суспензионным условиям проводили с использованием имеющихся в банке клеток НИИПББ следующих линий клеток ВНК-21 шведская и ВНК-21/c13, с использованием биологических мешалок фирмы Techne и в биореактора «BIOTRON» LIFLUS SP/SL 30. При культивировании в биологических мешалках Techne посевная концентрация клеток составляла 300-350 тыс./мл, а при проведении исследований в биореакторе «BIOTRON» LIFLUS SP/SL 30 концентрация клеток составляла не менее 500000 тыс.кл/мл. В качестве ростовой использовали среду ПСС с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. В зависимости от ростовых свойств и вида культуры клеток при выращивании в биологических мешалках Techne ежедневно или через каждые 2 сут подливали ростовую среду в количестве до 20% от общего объема. При культивировании в биореакторе в зависимости от увеличения количества клеток и показаний pH, также доливали свежую ростовую среду в необходимом объеме, при этом контролировали разведение количества клеток до уровня не менее 500000 тыс.кл/мл. Результаты ростовых свойств линии клеток ВНК-21 представлены в табл.3.2.

Таблица 3.2 – Суточный прирост культуры клеток ВНК-21 при суспензионном культивировании (n=3)

Используемый аппарат	Ростовая среда	Культура клеток	Посевная концентрация клеток, тыс/мл	Количество клеток, сут тыс/мл ( $\bar{X} \pm m$ )			
				1	2	3	4
Биологическая мешалка Techne	ПСС	ВНК-21 шведская	320±1	470±4	531±8	502±5	350±5
		ВНК-21/c13	333±2	490±5	552±6	530±8	390±6
Биореактор LIFLUS SP/SL 30	ПСС	ВНК-21 шведская	507±5	830±4	1120±9	1030±7	920±8
		ВНК-21/c13	512±7	844±8	1417±4	1525±6	1100±12

Эксперименты проведенных опытов показали, что на биологической мешалке культуры клеток ВНК-21 шведская и ВНК-21/c13 с использованием среды ПСС удается достичь прироста количества клеток практически в два раза в течение 3 суток. При дальнейшем культивировании наблюдается снижение количества живых клеток.

При этом культивирование клеток в биореакторе на аналогичной ростовой среде позволяет достичь трехкратного прироста клеток в течение 3 сут, на 4 сутки наблюдается незначительное снижение количества живых клеток.

На основании исследований можно сделать вывод, что биологические мешалки Techne подходят только для роста клеток в первые 2 суток. Во время испытания биореактора активная фаза роста клеток наблюдается в течение

первых 3 дней, при дальнейшем культивировании наблюдается постепенная гибель клеток. Эксперименты по разработке метода культивирования культур клеток ВНК-21 в биореакторе показали, что необходимо постоянно увеличивать количество добавляемой новой питательной среды для достижения дальнейшего роста клеток.

Таким образом, результаты работы показали, что обе протестированные клеточные линии подходят для культивирования в условиях суспензии.

**3.3. Суспензионное культивирование, значение посевой концентрации на ростовые свойства клеток.** Следующим этапом работы являлось определение влияния посевой концентрации клеток на пролиферативные свойства при суспензионном культивировании. Для этого культуры клеток ВНК-21 шведская и ВНК-21/c13, выращенные в стационарных условиях снимали диспергирующим раствором и проводили подсчет клеток для определения количества живых клеток. Далее культуральную суспензию с известным количеством клеток разводили ростовой питательной средой ПСС с содержанием 10% сыворотки КРС, и глутамина в концентрации 1г/л, до получения необходимой концентрации. Полученные концентраты суспензии клеток вносили в биологические мешалки для суспензионного культивирования. Культивирование клеток проводили при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , при постоянном перемешивании суспензии со скоростью 60-80 об/мин. Ежедневно отбирали пробы для определения уровня прироста клеток. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.3.

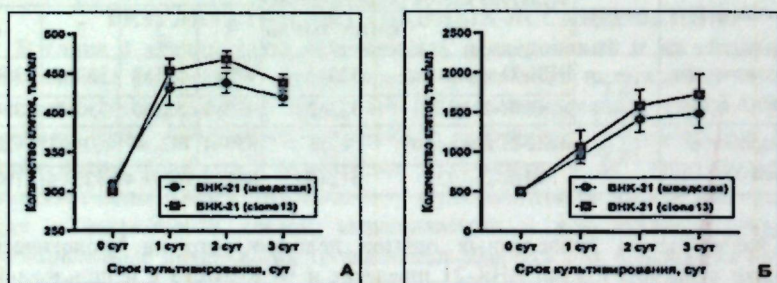


Рисунок 3.3 – Влияние посевой концентрации культуры клеток ВНК-21 на прирост при суспензионном культивировании.

Примечания: А – культуры клеток с посевой концентрации не менее 300 тыс. кл/мл; Б – культуры клеток с посевой концентрации не менее 500 тыс. кл/мл. Обе культуры клеток были выращены в питательной среде ПСС с содержанием 10% сыворотки крови КРС.

Результаты экспериментов показали следующее: испытанные культуры клеток при суспензионном культивировании на ростовой среде ПСС с концентрацией клеток ~300 тыс. клеток/мл дают незначительный прирост

клеток при культивировании. В тоже время при увеличении концентрации количества клеток до ~500 тыс. клеток/мл, отмечается значительный прирост клеток в среднем в 2-3 раза.

#### 3.4. Суспензионное культивирование клеток без смены ростовой среды

В работе использовали перевиваемую суспензионную линию клеток ВНК-21/c13. Культивирование клеток проводили с использованием биологических мешалок Techne при посевой концентрации клеток ~500 тыс. клеток/мл. Для культивирования использовали питательную среду ПСС с добавлением 10% сывороткой КРС, и глутамина в концентрации 1г/л. Эксперименты проводили без смены и доливки питательной среды. Результаты экспериментов представлены в табл.3.4.

Таблица 3.4 – Культивирование клеток ВНК-21/c13 в суспензионных условиях без смены ростовой среды (n=3)

Используемый аппарат	Посевная концентрация, тыс. клеток/мл	Количество клеток тыс/мл,сут				
		1	2	3	4	5
Биологическая мешалка Techne	~500±0,10	530±1	812±5	1024±20	1470±12	990±10
		660±0,9	890±1	1108±10	1681±15	1006±6
		590±20	877±10	1070±8	1668±10	1012±8

Результаты исследований показывают, что в течение 4 сут (срок наблюдения) наблюдается прирост количества клеток, затем динамика накопления активно снижается. Возможно, это связано с жизнедеятельностью клеток, т.е. из-за избыточного накопления продуктов метаболизма оказывает негативное влияние на клетки, что влечет за собой резкую гибель клеток. Таким образом, для культивирования в суспензионных условиях рекомендуется применять метод культивирования со сменой питательной среды, так как это дает возможность непрерывного накопления клеточной массы.

**3.7. Освежение штамма «VRC-RZ2» вируса бешенства.** Для освежения вируса бешенства были взяты шесть проб культуральной антирабической вирусосодержащей суспензии штамма «VRC-RZ2», хранившихся в лаборатории «Технологии культивирования вирусов». Данные пробы были освежены в культуре клеток ВНК-21/c13 методом пассирования, при этом была отобрана одна проба для дальнейших работ. Наличие вируса бешенства подтверждено результатами электронной микроскопии и в реакции ИФА. В дальнейшем проводили индикацию вируса в 48-луночных плашках и слайд-камерах, засеянных культурой клеток ВНК-21/c13. В первом случае результат определяли по цитопатическому действию вируса, во втором – индикацию

вируса определяли в реакции МФА. Результаты опыта показаны на рисунках 3.7.1. и 3.7.2.

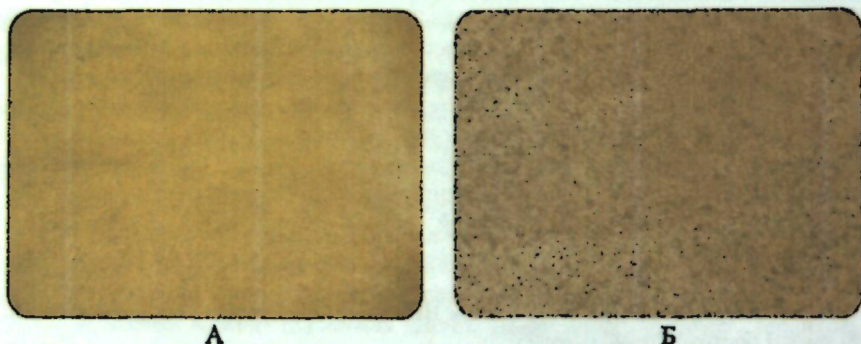


Рисунок 3.7.1 - Цитопатическое действие вируса бешенства в культуре клеток ВНК-21/c13.

Примечание: А – контрольная культура клеток, Б – зараженная культура клеток.

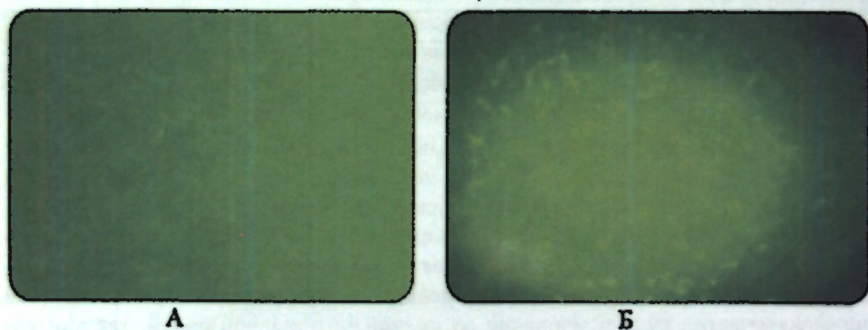


Рисунок 3.7.2 - Результаты индикации вируса в МФА.

Примечание: А – контрольная культура клеток, Б – зараженная культура клеток.

Как видно из рисунка 3.7.1, освеженный вирус проявляет характерное цитопатическое действие на зараженные клетки, тогда как в контрольных лунках изменений не отмечено. При постановке реакции МФА в зараженных лунках наблюдается специфическое изумрудное свечение, свидетельствующее о наличии рабического вируса.

Биологическую активность полученного матричного вируса определяли путем титрования на белых мышках, по 4 головы в группе, которым вводили вирус интрацеребрально в объеме 0,03 мл (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Определение биологической активности штамма «VRC-RZ2»

Группа животных	Разведения вируса	Пало	Выжило
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

У всех павших мышей в период болезни отмечены характерные клинические проявления болезни бешенства. Из данных, представленных в табл. 3.7, следует, что биологическая активность вируса составила  $6,0 \lg \text{МЛД}_{50}/0,03$ . При высевах на бактериальные среды установлено, что матричный материал стерилен, в связи с чем он был лиофилизирован, паспортизирован и передан для хранения в лабораторию «Коллекции микроорганизмов» РГП НИИПББ КН МОН РК.

3.8.1. Подбор оптимальной культуры клеток для репродукции вируса бешенства. В следующей серии опытов нам необходимо было подобрать чувствительную клеточную линию, позволяющую получить культуральные суспензии с высокими показателями репродукции. Для культивирования штамма «VRC-RZ2» использовали: первично-трипсицинированную культуру клеток ПЯ, ПЩ и перевиваемые культуры клеток: ВНК-21/c13, ПС, Vero и МДВК, выращенные в пробирках стационарным способом. Для этого культуры клеток заражали вирусом бешенства и культивировали при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  до проявления ЦПД. Биологическую активность полученных вирусосодержащих суспензий определяли путем титрования в культуре клеток ПС.

В результате проведенных работ установлено, что из испытанных линий клеток чувствительными к вирусу бешенства оказались культуры клеток ПС и ВНК-21.

ЦПД в культуре клеток ПС отмечалось уже на 3 сутки культивирования в виде округлых светопреломляющих клеток, образующих небольшие конгломераты от которых исходили тяжи. При дальнейшем культивировании количество очагов и их размеры увеличивались, на 5-6-е сутки наблюдалось отслоение пораженных клеток, небольшое разрежение монослоя, а также появление большого количества отдельных светопреломляющих клеток округлой формы. Титр вируса 1-го, 5-го пассажного уровня в культуре клеток ПС составил  $4,50 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ,  $5,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ , соответственно.

ЦПД в культуре клеток ВНК-21 также отмечалось уже на 3 суток культивирования, но было менее выраженным. Наблюдалось округление клеток, некоторая разрозненность, сменяющаяся с увеличением срока культивирования агрегацией пораженных клеток с последующим отслоением от стекла агрегатов клеток. Титр вируса в суспензиях полученных на культуре клеток ВНК-21 составил -  $4,75-6,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

В культурах клеток ПС, ВНК-21/с13 при помощи МФА был выявлен антиген ВБ. Исследование проб из вирусосодержащих суспензий, полученных в линиях клеток ПС, ВНК-21/с13 электронной микроскопией, показало наличие вирионов ВБ (рисунок 3.8.1.1).

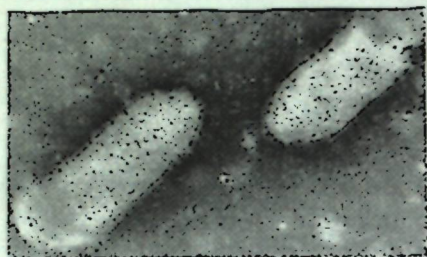


Рисунок 3.8.1.1. – Электронная микроскопия вирионов вируса бешенства из инфицированной культуры клеток ВНК-21/с13. Ув.200000.

В остальных испытанных культурах клеток проявление цитопатической активности ВБ в течение 3 последовательных пассажей не обнаружено. При исследовании электронной микроскопией культуральных суспензий различных пассажей ВБ также не обнаружен, а вирусный антиген не выявлен МФА.

Следует отметить, что при титровании ВБ в культуре клеток ВНК-21/с13 на 6-10 сутки наблюдалось появление неспецифической дегенерации как в инфицированных, так и в контрольных культурах клеток, по-видимому, это связано со старением клеток используемой культуральной линии. Описанные обстоятельства создавали затрудненность при считывании результатов. Поэтому в качестве тест системы для определения инфекционной активности ВБ была выбрана культура клеток ПС, лишенная аналогичных недостатков. Цитопатическое действие ВБ в культуре клеток ПС и отсутствие аналогичных изменений в не инфицированных культурах клеток отображены на рисунке 3.8.1.2 (А, Б).

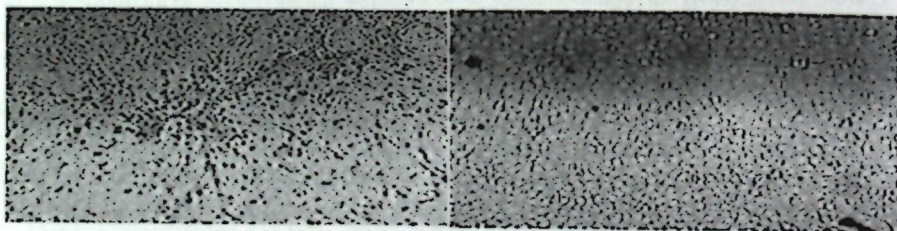


Рисунок 3.8.1.2 - Цитопатическое действие ВБ и отсутствие аналогичных изменений в не инфицированных культурах клеток.

Примечание: А - ЦПД вируса бешенства на культуре клеток ПС, Б- Контроль, не инфицированная культура клеток ПС.

В результате проведенных исследований по подбору чувствительных линий культур клеток, установлено, что оптимальной к ВБ являются культуры клеток ПС и ВНК-21/с13.

**3.8.3 Определение оптимального срока культивирования вируса бешенства при суспензионном культивировании.** В экспериментах использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/с13, питательную среду ПСС с добавлением L-глутамина 0,6 г/л, сыворотку КРС 2 %, вирус бешенства штамм «VRC-RZ2» (5 пассаж на ВНК-21/с13, титр 7,25 lg МЛД<sub>50</sub>/мл).

В ходе экспериментов были определены пролиферативные свойства используемой линии клеток, инфицированной вирусом бешенства штамм «VRC-RZ2», а также линия незараженных клеток ВНК-21/с13. Результаты исследований представлены на рисунке 3.8.3.1.

Из данных рисунка следует, что через 24-48 ч. после заражения наблюдалась наибольшая пролиферативная активность клеток. Концентрация жизнеспособных клеток в зараженной и интактной культуре ВНК-21/с13 составляла 1,45 и 1,5 млн клеток на мл, соответственно. Индекс пролиферации в данный период составил 2,5. При последующем культивировании отмечали снижение количества жизнеспособных клеток в суспензии и параллельное увеличение доли мертвых клеток. По истечению 72-96 ч. в инфицированных клетках процент жизнеспособных клеток составил 54-84 %. При достижении уровня 90 % мертвых клеток, культивирование останавливали. Указанный уровень был достигнут на 5 сутки культивирования для зараженной культуры клеток, тогда как для интактной культуры клеток составил - 8 суток.



Рисунок 3.8.3.1 – Культивирование зараженных и интактных клеток ВНК-21/с13 суспензионным методом.

В верхней части столбцов указан процент жизнеспособных клеток от общего числа клеток суспензии.



Результаты исследований инфекционной и антигенной активности проб вирусных суспензий, отобранных через 24-120 ч. после заражения, представлены на рисунке 3.8.3.2.

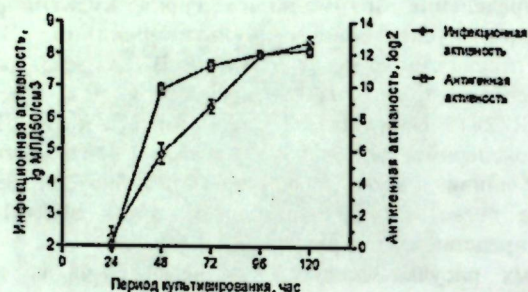


Рисунок 3.8.3.2 - Инфекционная и антигенная активности вирусных суспензий в зависимости от срока культивирования.

Данные, приведенные на рисунке 3.8.3.2, свидетельствуют о наличии признаков репродукции вируса в суспензионной культуре клеток по истечению 24-120 ч. культивирования вируса. Антигенная и инфекционная активность проб вирусной суспензии через 48-72 ч. составила 10-11 log<sub>2</sub> и 4,75-6,25 lg МЛД50/мл, соответственно. В пробах суспензии отобранных через 96-120 ч. отмечены пиковые значения биологической активности. Следует отметить, что при проведении корреляционного анализа, выявлена высокая степень зависимости ( $r=0,97$ ), между инфекционной и антигенной активностью в пробах вирусных суспензий.

Учитывая сроки снижения жизнеспособности клеток и отсутствия пролиферативной активности зараженной культуры ВНК-21, зафиксированные через 72-96 ч, а также максимальное накопление в суспензии клеток инфекционной и антигенной активности регистрируемое к 96-120 ч. следует заключить, что оптимальным периодом культивирования вируса бешенства является 96 ч.

### 3.9 Воспроизводимость вируса при крупномасштабном культивировании

3.9.1 Суспензионное культивирование вируса бешенства. На первом этапе необходимо было подобрать оптимальную питательную среду для суспензионного культивирования линии клеток ВНК-21/c13, обеспечивающую максимальную концентрацию клеток в суспензии. С этой целью использовали питательные среды ПСС и GMEM (с добавлением триптозо-фосфатного бульона в соотношении 1:10). Культивирование проводили в спиннерах объемом 175 мл на магнитных мешалках «Techne» при 40 об/мин. В процессе

культивирования поддерживали уровень pH в пределах 7,2-7,4 путем добавления бикарбоната натрия. Результаты исследований представлены в таблице 3.9.1.

Таблица 3.9.1 – Выбор оптимальной питательной среды для культивирования линии клеток ВНК-21/c13

Питательная среда	Срок культивирования, ч	Концентрация клеток (кл/мл)	Живых клеток %
ПСС	96	$1,35 \times 10^6$	96
GMEM	96	$7,64 \times 10^5$	100

Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация клеток после 96 ч. культивирования при использовании питательной среды ПСС практически в 2 раза выше, чем при использовании среды GMEM. Немаловажным фактором является высокая стоимость последней среды.

Таким образом, дальнейшие эксперименты по культивированию клеток ВНК-21/c13 суспензионным методом с использованием питательной среды ПСС первоначально проводили в спиннерах различных объемов (175, 350, 700 мл), суспензию из которых последовательно переносили из спиннеров малых объемов в более объемные.

Из спиннеров ежедневно отбирали пробы с целью подсчета клеток и контроля уровня pH. Содержимое четырех спиннеров объемом по 700 мл объединяли в общий сосуд и использовали для суспензионного культивирования клеток в биореакторе «БИОТРОН». Культивирование при следующих параметрах: температура питательной среды ( $37 \pm 05$ ) °C, pH – 7,2.

После культивирования клеток в течение 120 ч. при концентрации клеток  $1,2 \times 10^6$  кл/мл в биореактор вносили производственную расплодку ВБ и инкубировали в течение 72 ч с ежедневным подсчетом живых и мертвых клеток. В результате была наработана вирусосодержащая суспензия ВБ в объеме 7,8 л, разлитая в матрасы и заложенная на хранение при температуре минус 20 °C.

3.10. Исследования по разработке форм приготовления вакцины пригодных для вакцинации диких животных. Для приготовления приманок с использованием полимеров, готовили 30 % раствор желатина (Sigma – Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) или 20 % раствор агара на дистиллированной воде, и выдерживали в течение ночи (18 ч), чтобы произошло набухание полимера. Куриные эмбрионы (Птицефабрика Аллель-Агро, Казахстан) измельчали на гомогенизаторе, добавляли мясокостную муку. Раствор полимера нагревали до 60 °C в течение 20 мин, затем охлаждали до 37 °C и вносили в стакан содержащий куриные эмбрионы, мясо-костную муку и ароматизатор для говядины (говяжья эссенция), гомогенизировали 10 мин при 3000 об / мин.

Полученную смесь, разливали в специальную форму (рисунок 3.10.1), в которой находится блистер, содержащий вакцину, после чего проводили охлаждение при 4 °С в течение 1 ч.



Рисунок 3.10.1 – Форма приманки, приготовленная с использованием полимеров.

Полученная брикет-вакцина массой 25-30 г. имеет цвет от светло-коричневого до темно-коричневого со специфическим запахом. В приманке содержится вирус в жидком виде в дозе  $10^{6.75}$  TCID<sub>50</sub>. Готовая брикет-приманка имеет вид полого прямоугольного параллелепипеда, с размерами сторон 5×3×2 см. Брикет приманка содержит одну дозу вакцины.

Для проверки привлекательности для животных испытывались различные формы и составы приманок. В качестве модели диких животных были использованы бездомные собаки в возрасте от 3 мес. и выше. Животных в условиях вивария выдерживали в течение 1 сут. без корма. Животных содержали по 5 голов в одном помещении вивария. Приманки выкладывали по 10 образцов каждой приманки и регистрировали предпочтение животных в поедании различных видов приманок. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Поедаемость брикет-приманок собаками

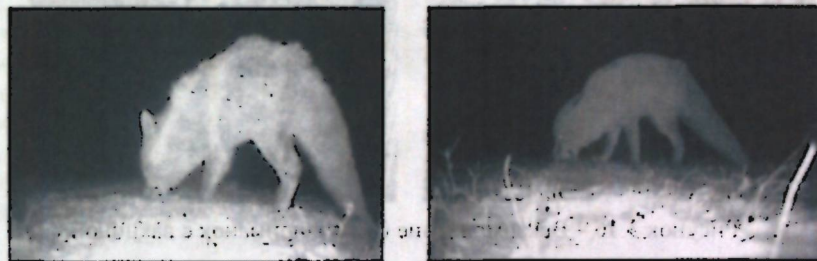
Форма и состав приманки	1 группа животных	2 группа животных
Брикеты (мясо-костная мука, куриные эмбрионы, желатин)	90%	80%
Брикеты (мясо-костная мука, куриные эмбрионы, ароматизатор для говядины, желатин)	100%	100%

Учитывая данные таблицы 3.10, следует заключить, что наибольшее предпочтение животные показали к модифицированной приманке, приготовленной в виде брикетов и цилиндров, в составе которой выходили мясо-костная мука, куриные эмбрионы, ароматизатор для говядины и желатин.

Результаты проведенных исследований показывают, что модифицированный состав приманки является наиболее привлекательным для плотоядных животных.

Таким образом, разработана приманка пригодная для применения на территории Жамбылской области, поедаемость которой составила 100%.

В результате проведенных исследований нами была приготовлена серия приманок, в состав которых выходили мясо-костная мука, куриные эмбрионы, ароматизатор для говядины, желатин. Данная приманка была испытана в естественных условиях обитания диких животных. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 3.10.3.



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

Рисунок 3.10.3 – Испытание приманки в полевых условиях (ночная съемка на фотоловушку – Moultrie® M990i).

**3.16 Эффективность вакцины у бездомных собак и диких плотоядных животных.** Для исследований были использованы 46 бездомных собак в возрасте 3-12 месяцев, 8 степных лисиц Корсаков (*Vulpes corsac*) и 8 степных волков (*Canis lupus campestris*). Перед вакцинацией животные были случайным образом разделены на три группы: (1) группа для проверки на безопасность вакцины (N = 12), (2) группа для оценки эффективности (N = 30) и (3) группа контрольная (N = 20) (таблица 20). После карантина животных выдерживали в течение 1 суток без корма, после чего проводили вакцинацию методом скармливания брикет-приманки содержащую блистер с вакцинным препаратом.

Для изучения безопасности пероральной вакцины животным (собакам 6, 3 корсакам и 3 волкам) скармливали 10-кратную дозу вакцины на животное. Ежедневно за животными проводили клиническое наблюдение в течении 20 суток. После скармливания брикет-вакцины у животных на 5 и 10 суток отбирали пробы слюны и крови для исследований по определению выделения вируса бешенства.

Для изучения эффективности пероральной вакцины животным (собакам 24, 3 корсакам и 3 волкам) скармливали по одной дозе (приманка) вакцины на

животное (рисунок 3.16). Для определения иммунных реакций вируснейтрализующих антител (ВНА) на вирус бешенства сыворотку крови (10 мл на пробирку вакутайнер Бектона Дикинсона) собирали через 14 (N = 30 животных/группа), 30 (N = 27 животных/группа), 60 (N = 24 животных/группа), 90 (N = 21 животное/группа), 120 (N = 19 животных/группа), 150 (N = 17 животных/группа), 180 (N = 14 животных/группа) и 210 (n = 11 животных/группа) дней после вакцинации и исследовали в реакции нейтрализации (РН).



Рисунок 3.16 – Вскармливание брикет-приманок с вакциной

Для определения продолжительности защитного иммунного ответа против вирусной инфекции бешенства у бродячих собак, трем вакцинированным и двум не вакцинированным собакам был введен вирулентный штамм CVS через 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 210 дней после вакцинации. В качестве вирулентного штамма использовали «CVS» вируса бешенства с расчетной дозой вируса 1000 МПД<sub>50</sub>/мл. Исследование с контрольным заражением проводилось только на собаках.

Таблица 3.16 – Животные и исследуемые группы

Группа	Бродячие собаки	Корсак	Степные волки	Всего
Группа безопасности	6	3	3	12
Группа эффективности	24	3	3	30
Контрольная группа	16	2	2	20
Всего	46	8	8	52

Тест-реакции нейтрализации проводили на мышях массой 8-10 г. Мышей инокулировали внутримозгово, используя 0,03 мл инокулята, строго следуя методике, рекомендованной ВОЗ. Им вводили штамм CVS в дозе 50 МПД<sub>50</sub>/0,03 мл.

При иммунизирующей дозе 10<sup>6,50</sup> ТПД<sub>50</sub> у собак через 14 сут после вакцинации уровень ВНА составлял 0,59±0,12 МЕ/мл, через 30 суток –

1,37±0,48 МЕ/мл, на 90 суток после вакцинации уровень ВНА составлял 1,02±0,40 МЕ/мл, и через 210 суток уровень ВНА составил 0,48±0,48 МЕ/мл.

Динамика накопления уровня ВНА в сыворотке крови вакцинированных диких плотоядных животных (корсаки и волки) была ниже, чем у собак, ~ 0,08-1,15 МЕ/мл. Тогда как, у диких плотоядных животных на 180 суток после вакцинации уровень ВНА составил <0,5 МЕ/мл (рис.19Б, 19С). Анализ полученных результатов данных исследований показывает, что уровень и динамика ВНА в сыворотках крови иммунизированных животных, между тремя группами имела существенную разницу (p ≤ 0,001) на 60 и 210 суток после вакцинации.

**Контрольное заражение.** После вакцинации с интервалом в 30 сут. проводили контрольное заражение вакцинированных и невакцинированных животных, все вакцинированные собаки в течение 180 сут. не реагировали на введение вирулентного вируса, тогда как контрольные группы заболели с характерной клинической картиной бешенства. На 210 сут. при контрольном заражении вирулентным вирусом, из 3 вакцинированных собак у 1 собаки на 14 сут начали проявляться первые клинические признаки болезни и это животное пало на 24 сут. после заражения с такими же клиническими признаками болезни, как и у контрольной группы.

Однако, у контрольных животных (не вакцинированные собаки) первые клинические признаки болезни отмечались уже на 6 сутки после введения вирулентного вируса, при этом контрольные животные погибли на 11-13 сутки.

Специфичность падежа была подтверждена с помощью теста иммунофлуоресценции. Все образцы от контрольных животных оказались положительными на ВБ. У вакцинированных собак в пробах гиппокампа и слюнных желез с помощью иммунофлуоресценции ВБ не обнаружен.

При иммунизации животных одной дозой вакцины на 14 сут после вакцинации 85% животных имели достаточный уровень ВНА. Начиная с 30 сут и на всем протяжении опыта, необходимый для защиты от вирулентного вируса бешенства уровень ВНА был выявлен у 100% вакцинированных животных. Титры были стабильны в течение 180 сут, на 210 сут титр ВНА снизился до < 0,50 IU/mL. При этом в группе вакцинированных собак на 210 сутки после вакцинации выживаемость составила 93,7%. Несмотря на это, испытываемая вакцина является эффективным и безопасным препаратом для профилактики бешенства.

## ВЫВОДЫ

1. Подобрана оптимальная культура клеток для репродукции вируса бешенства штамма VRC-RZ2.
2. Отработаны оптимальные параметры культивирования вируса бешенства, штамм VRC-RZ2 в культуре клеток ВНК-21/с13, позволяющие

нарабатывать вирусную биомассу в суспензионных условиях с биологической активностью 5,75-6,00lg ТЦД50/мл.

3. Масштабирована технология суспензионного культивирования вируса бешенства.

4. Совершенствована технология изготовления пероральной вирусвакцины из штамма VRC-RZ2 вируса бешенства, в частности модифицирован состав приманки, с добавлением современных приманивающих ароматизаторов. Приманка обладает высокой привлекательностью и 100 % поедаемостью для плотоядных животных, и низкой себестоимостью.

5. Безопасность и иммуногенность полученного вакцинного препарата соответствует требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам.

6. Подтверждено, что модифицированный штамм VRC-RZ2 ВБ, пригоден к использованию в качестве вакцинного кандидата против бешенства диких плотоядных, и безопасен для целевых животных. При этом установлено, что скармливание животному 10 доз вакцины не оказывает отрицательного действия на организм.

7. Вакцина в дозе не менее 5,75 lg ТЦД50/мл провоцирует выработку вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства после однократного поедания животным (титры ВНА – до 5,20 log<sub>2</sub>), а также защищает животных от заболевания после заражения штаммом CVS. При этом установлено, что вируснейтрализующие антитела сохраняются в достаточном количестве после вакцинации в течение не менее 200 суток.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Совершенствованную технологию изготовления культуральной пероральной вакцины из штамма VRC-RZ2 вируса бешенства предлагается использовать в биологической промышленности для создания безопасной и иммуногенной вакцины для диких плотоядных животных.

Для практического использования предлагаются нормативно-технические документы на производство культуральной пероральной вакцины из штамма VRC-RZ2 вируса бешенства, которая одобрена ученым советом НИИПБ, утверждена директором института, и состоит из следующих документов:

- инструкции по изготовлению и контролю культуральной пероральной вакцины против бешенства животных;
- стандарта организации на культуральную пероральную вакцину против бешенства животных [СТ 405-1919-04 ГП-073-2012];
- наставление по применению культуральной пероральной вакцины против бешенства животных.

#### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Определение оптимальных параметров суспензионного культивирования линии клеток ВНК -21/С 13 [Текст] / [Ж. Ж. Саметова, Л. Г. Мараховская, Ж. Т. Аманова, Е. Г. Шахметов и др.] // Биобезопасность и биотехнология. – 2021. - №5. – С. 37-41.

2. Определение оптимальной концентрации димерэтиленмина для инактивации вируса бешенства штамма «VRC-RZ2» [Текст] / Ж. Б. Кондибаева, К. Д. Жугунисов, Н. К. Далбаев, З. Д. Ершебулов, и др. // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2019. - №3 (102) - С. 223-231.

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

4. Ершебулов, З. Д. Безопасность пероральной вакцины против бешенства на диких и домашних плотоядных животных [Текст] / [К. Д. Жугунисов, Е. А. Булатов, Д. С. Таранов, и др.] // Вестник Евразийского университета им. Л. Гумилева.-2016. - №4 (113), - С. 40-49.

5. Производственные испытания иммуногенной активности инактивированной вакцины против вируса бешенства животных [Текст] / [Д. С. Таранов, Е. А. Булатов, К. Д. Жугунисов, З. Д. Ершебулов и др.] // Вестник Казахского Национального университета. Серия биологическая. - 2016. - №4 (69) - С. 124-131

6. Ершебулов, З. Д. Способ изготовления вакцины пероральной антирабической против бешенства диких плотоядных животных [Текст] / [А. Р. Сансызбай, Е. А. Булатов, Е. С. Жилин и др.] // Полезная модель №101894 от 30.09.2015

7. Ершебулов, З. Д. Способ изготовления вакцины культуральной антирабической инактивированной для профилактики бешенства животных [Текст] / Е. С. Жилин, А. Р. Сансызбай, Н. К. Далбаев // Полезная модель №99704 от 12.08.2015, опубликована 2015/0941.1.

8. Экспериментальное изучение возможности культивирования вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» в суспензионной культуре клеток ВНК-21 [Текст] / [Д. С. Таранов, Е. С. Жилин, З. Д. Ершебулов и др.] // Сбор. матер. II-й междунар. науч. конф. – пгт. Гвардейский.- 2014. - № 4. - С.175-178.

9. Ершебулов, З. Д. Вакцина пероральная против бешенства животных (НИИПБ) / К. Д. Закирья // СТ 405 -1919-04 ГП-127-2020. НТД

10. Критерии и методология для оценки биологической безопасности [Текст] / [Е. Н. Тронцкий, Е. Н. Жилин, С. М. Мамадалиев, К. Б. Баракбас и др.] // Сбор. матер. Межд. научно-практ. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития». – Алматы, 2008. - С. 595 -598.

Ершебулов Закир Джапаровичтин "Жапайы жырткыч жаныбарлардын оозу аркылуу берилүүчү кутурмага каршы вакцинаны өндүрүү технологиясын өркүндөтүү" темасындагы 03.01.06 - биотехнология адистиги боюнча биология илимдердин кандидаты окумуштуулук даражасын алуу үчүн диссертациясынын 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, биотехнологиялык методдору, 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 ВНК-21с13 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 вирусунан 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 №101895 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.

## 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 культивирования клеток ВНК-21с13 в суспензионных условиях.

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 рекомендовать данный штамм вируса в качестве основы для оральной вакцины против бешенства. Новизна полученных результатов подтверждена патентами на способ изготовления вакцины пероральной антирабической против бешенства диких плотоядных животных: 1 - №101894 от 30.09.2015., 2 - №99704. от 12.08.2019.

Имунобиологические 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.

## RESUME

dissertation of Yershebulov Zakir Dzhaparovich on the theme "Improving the technology of manufacturing the rabies oral vaccine for wild carnivores" presented for the degree of Candidate of biological sciences in 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 the improvement of the manufacturing the technology and testing rabies vaccine for prevention of rabies among wild carnivores.

**Research methods and equipment:** suspending 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

Объем 1,625 уч.издл.  
Тираж 120 экз. Заказ № 247

Типография ОсОО «Алтын Принт»  
720000, г. Бишкек, ул. Орозбекова, 44  
Тел.: (+996 312) 62-13-10  
e-mail: [altyntamga@mail.ru](mailto:altyntamga@mail.ru)



