

## CVS-11» ҚҰТЫРЫҚ ВИРУСЫНЫҢ ШТАММЫН ӨСІРУДІҢ ОҢТАЙЛЫ ПАРАМЕТРЛЕРІ

*А.А. Абдуалиева<sup>1</sup>, Н.Н. Ахметсадықов<sup>1</sup>,  
К. Д.Кулманбетов<sup>2</sup>, Т.А.Иманбекова<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Қазақ ұлттық аграрлық университеті, <sup>2</sup>«Антиген», ғылыми-өндірістік кәсіпорны*

### **Аннотация**

Ауыл шаруашылығында отандық өнім ретінде өсінділік вакцинаны өндірудің технологиялық проблемаларын (штамм таңдау, жасуша өсіндісіне бейімдеу, өсірудің әдістері, биопрепараттардың қауіпсіздігін) нақты шешуді қажет ететін ветеринария биотехнологиясында өзекті мәселелердің бірі болып табылады.

Мақалада құтырық вирусының CVS-11 штаммын өсірудің оңтайлы параметрлері анықталды. ВНК-21 (с-13) жасуша өсіндісін стационарлық әдіспен өсіру нәтижелері келтірілген. Зертханалық құрылғылардағы жасушаларды күрделі өсірудің оңтайлы параметрлері нақтыланды. CVS-11 штаммын өсіруді ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісіне бейімдеу процесінің масштабты аспектілері зерттелді.

Зерттеудің мақсаттары: ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінде құтырық вирусының CVS-11 штаммын өсірудің жағдайларын оңтайландыру бойынша зерттеу жүргізе отырып, болашақта құтырыққа қарсы вакцина алудың эксперименттік үлгілерін жасау технологиясының иммунобиологиялық қасиеттерін жақсарту.

Осы мақсатқа жету үшін келесі міндеттер қойылды:

- дамылсыз өсетін ВНК-21 жасуша өсіндісін өндіру технологиясын жасау;
- құтырық вирусының CVS-11 штаммын өсіру әдісін ұсыну;
- құтырыққа қарсы вакцинаны алуға қолайлы құтырық вирусының өсіндісінің әдісін көрсету;
- әртүрлі температурада ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінде құтырық вирусін көбейту.

**Кілттік сөздер:** CVS-11, ВНК-21, жасуша өсіндісі, моноқабат, вирус, құтырық, пассаж, суспензия, титр, антидене, антиген.

### **Кіріспе**

Құтырық - адамдар мен жануарлардың қауіпті жұқпалы аурулары тобына жатады, орталық жүйке жүйесінің зақымдануымен,

соңы өліммен аяқталатын және ең кең таралған зооантропоноздардың бірі болып табылады. Кейбір зерттеушілердің пікірінше, бұл ауру

экономикалық зиян келтіретін зооноздарға жатады [1, с. 303].

Әлемде жыл сайын құтырық ауруынан 50 мың адам және 1 миллионнан астам жануар зардап шегеді екен. Күрделі эпидемиялық және эпизоотиялық жағдай бүкіл әлемдегі бағдарламалық жасақтамаларға қарағанда, құтырықта байқалады. ДДСҰ мәліметтері бойынша, жыл сайын 10 миллионға жуық адам ауруға күдік тудыратын жануарлармен байланысады, олардың 4 миллионы арнайы медициналық көмек алады [2, с. 9-10].

Үй жануарлары мен ауылшаруашылық жануарларын вакцинациялау үшін әдетте инактивацияланған вакциналар қолданылады, ал жабайы сүтқоректілердің арасында құтырықтың алдын алу үшін таблетка вакциналар қолданылады [3,4,5].

Заманауи биотехнологияда, құтырыққа қарсы вакциналар өндірісінде әр түрлі әдістерді - суспензия және дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінде стационарлы әдісі қолданылуда [6, с. 8-9].

Азия елдерінде құтырық ауруынан жыл сайын 31000 адам өлімге ұшырайды. Соңғы бірнеше іс-шаралар, оның ішінде Дүниежүзілік құтырық күні, ғылыми қоғамдастықтың, мемлекеттік органдардың, бұқаралық ақпарат құралдарының және қоғамның назарына жеткізілді. Бұл ветеринария және денсаулық сақтау органдары арасындағы ынтымақтастықтың артуына, сонымен қатар Азиядағы құтырық ауруының негізгі көзі және

тасымалдаушысы болып табылатын иттердегі құтырықты бақылау мен жоюға қажетті барлық деңгейдегі қатысуға әкеледі. Үндістан мен Филиппин сияқты Азия елдері құтырықты 2020 жылға дейін жоюды қабылдады. Бүкіләлемдік құтырық күнін қолдау мақсатында Азиядағы құтырық аурулары сарапшылар бюросы (AREB) 2007 жылғы 5-7 қыркүйекте 4-ші отырысын өткізді, оның мақсаты адамдарда құтыру ауруын азайту стратегиясын талқылау болды. Адамдардағы құтыру ауруының алдын алуға ДДҰ-ның экспозицияның алдын-алу шараларын жақсарту арқылы алдын алуға болады. Сонымен қатар, иттердегі құтырық көп болған жерлерде құтырықты бақылау әлі қол жетімді болмаған немесе нәтижесіз болған жағдайда, құтырықтың негізгі құрбаны болған балаларды жүйелі түрде вакцинациялау олардың мерзімінен бұрын өлімінің алдын алады [7, с. 8647–8650].

2017 жылы Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы, Дүниежүзілік жануарлар денсаулығы ұйымы, БҰҰ Азық-түлік және ауылшаруашылық ұйымы және ғаламдық құтырық альянсы 2030 жылға дейін адамда құтырудан болатын өлімді жою жөніндегі стратегиялық жоспар құрды. Бұл процесс туралы ақпараттандыру үшін құтырық ауруынан биологиялық өнімдер өндірісінің өндірістік қуаттылығы мен сипаттамаларына зерттеу жүргізілді. Өндірістік препараттарды көптеген өндірушілер көбейте алады, бірақ елдің сұранысына байланысты

болады, шектеулі нарықты кеңейту ұзақ мерзімді жоспарлауды қажет етеді. Егер елдер биологиялық қажеттіліктерді болжайтын және өндіріс мерзіміне жауап беретін құтырықты жоюдың ұлттық бағдарламаларын жүзеге асырса, өндірушілер жануарарға байланысты құтырықтың өлімін жаһандық жою үшін болашақ жабдықтауға қойылатын талаптарға жауап бере алатын еді [8].

Құтырық вирусы гликопротеинінің антигендік өзгерісі (CVS-11) зерттелді. Бейтараптандыруға төзімді варианттар жоғары жиіліктегі (10-нан бастап) *in vitro*-да оқшауланды ( $10^{-5}$ ) антигликопротеидті моноклоналды антидене болған кезде. Осы нұсқалардың талдауы 24-тің бір немесе бірнеше топтарымен бейтараптандырылмаған нұсқалардың топтасуы негізінде кемінде үш функционалды моноклоналды антиденелер тәуелсіз антигендік аймақты анықтады. Радиоиммуноақпараттық байқау осы үш антигенді учаскенің біреуі топологиялық жағынан ерекшеленетінін, ал қалған екеуі бір-біріне жақын екендігін көрсетті. Сонымен қатар, бейтараптандыруға төзімді нұсқалардың көпшілігі (бірақ бәрі бірдей емес) сәйкес моноклоналды антиденелерді байланыстыра алмайтындығы көрсетілді. Өзгерген антигенділігі бар вирустар көрсетілген антиденелер болмаған жағдайда *in vitro* бірнеше жолдан кейін вирус қорларында жиналады. Сонымен қатар, нұсқалар тышқандарды моноклоналды антиденемен

емдегеннен кейін *in vivo*-да оқшауланды [9, с.843-851].

Құтырық вирусын бейтараптандыратын антидене (ВНК) деңгейін анықтау иммунитеттің әсерін сандық бағалауға негіз береді. Флуоресценттік белгісі бар изотиоцианат (FITC) моноклоналды антиденесі бар инфекциялық жасушаларды анықтау және антиген ретінде инфекция вирусының (CVS) -11 штаммын пайдаланып флуоресценттік антиденелерді бейтараптандырудың дәстүрлі сынағы (FAVN) қымбат және жоғары сапалы реактивтер жиі қолданылады. Мұнда біз CVS-11 штаммының кері генетикалық жүйесі негізінде күшейтілген жасыл флуоресцентті ақуызды (eGFP) тұрақты түрде білдіретін rCVS-11-eGFP рекомбинантты вирустық штаммын сипаттаймыз. RCVS-11 штаммымен салыстырғанда, rCVS-11-eGFP штаммы *in vitro* өту тұрақтылығымен және *in vivo* патогенділігімен ұқсас өсу қасиеттерін көрсетті. FAVN-eGFP әдісі қояндарды ВНК титрлеуді тез, үнемді, нақты және жоғары тиімді бағалауға мүмкіндік береді [10, с.1578-1589].

Матрастардағы жасушаларды 37°C температураға өсіру бойынша вирус жұқтырғанға дейін орындалған. Вирус 18 сағат бойы мұздатқыш камералардан алынып, бөлме температурасында ериді, мұқият араластырылады және вирус титрі анықталады. Әрбір вирустық үлгі, параллельді титрленген, жасуша өсіндісінің бір түрінде көбею арқылы алынған гомологтық және тестілік жасушалық культура

болып саналады. Вирустың болуы оның цитопатиялық әсерінде (ЦПӨ) анықталады, ал титрі Рид және Менч әдісі бойынша есептеледі [11, 12].

Құтырық вирусының өндірістік штамдарын және жасуша өсіндісін өсірудің оңтайлы параметрі ВНК-21 сублиниясын әзірлеу үшін Игла ДМЕМ және Эрла тұзды ерітіндісі негізінде 199 қоректік ортасы 1:1 қатынасында, В тобындағы витаминдердің екі еселенген жиынтығына 0,6 г/л глутамин, 8%-ды ірі қара қан сарысуын қосу арқылы тиімді нәтижеге ие болатындығы анықталды. Салыстыруға алынған басқа жасуша өсінділеріне қарағанда, ВНК-21 сублиниясында жасуша концентрациясы 1,5 л матроста 0,3-0,5 млн/мл жасушасанының бар екендігі анықталды сондай-ақ ВНК-21 (М) жасуша өсіндісінде құтырық вирусының титрі тұрақты түрде  $4,3 \pm 4,0 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{мл}$  көрсетті [13, с. 3-6].

### **Зерттеу материалдары мен әдістемесі**

#### *Вирустық материал*

Зерттеу жұмысында құтырық вирусының келесі штамы қолданылды:

- ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісіне бейімделген, инфекциялық титрі 6,00-6,50  $\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  болатын CVS-11 (VR 959, ANSES, France) құтырық вирусының штамы.

#### *Жасуша өсіндісі*

- ВНК-21 сирялық атжалманның бүйрек жасушасы.

#### *Жануарлар*

Дайындалған вирустық суспензия үшін келесі жануарлар:

- салмағы 10-12 грамм болатын зертханалық ақ тышқандар.

#### *Қоректік орта*

Вирусты суспензия мен моноқабатты жасуша өсіндісін өсіру үшін:

- Игла-МЕМ 199 ортасы;

- Фетальді қан сарысуы

- L-глутамин;

- антибиотик – ципролет 1000ЕД;

Вакцинаны жаппай шығару үшін құтырық вирусын өсіру әдісі қажет, онда оның иммуногендік қасиеттері өзгермейді және вирус вакцина жасау кезінде шоғырлануды қажет етпейтін жоғары титрлерде жиналады.

Инактивацияланған вакциналарды алу үшін әртүрлі инактиваттар қолданылады және инактивация үшін оңтайлы жағдайлар таңдалуы қажет.

Мұндай жағдайларда вирус өзінің жұқпалы қасиеттерін толығымен жоғалтып, антигенділігі сақталуы керек. Күрделі эпидемиялық және эпизоотиялық жағдай бүкіл әлемдегі бағдарламалық жасақтамаларға қарағанда, құтырықта байқалғандықтан, оны шешу өзекті мәселе болып табылады. Сондықтан, құтырыққа қарсы вакциналар жасау технологиясын игеру, оны ветеринария саласына ұсыну зерттеу жұмысымыздың басты шарты болып отыр.

- 0,02% версен ерітіндісі;
- 0,25% трипсин ерітіндісі;
- 0,10 М фосфатты буферлі ерітінді рН-7.2-7.4;
- ИҚМ қан сарысуы.

#### *Құрал-жабдықтар*

Тәжірибелерде келесі жабдықтар пайдаланылды:

- көлемі 1,5 литр болатын шыны төсеніштер;
- көлемі 50 мл болатын пластикалық 1 реттік матрастар;
- көлемі 600мл болатын пластикалық 1 реттік матрастар;
- көлемі 10 мл пенициллин флакондары;
- сыйымдылығы 1,2,5 және 10 мл серологиялық пипеткалар (МЕМСТ 1770-74);
- рН метр;
- температурасы 37°C болатын термостат;
- температурасы 56°C болатын су моншасы;
- сынаптермометрі;
- зертханалық центрифуга;
- төмен температуралы тоңазытқыштар;
- Микроскоп моделі Motic AE30 TRINO
- Горяев камерасы

#### **Әдістер**

##### *Жасуша өсіру*

ВНК-21 (с-13) дамылсыз өсетін жасуша өсіндісін арнайы өсінділік пластикалық флакондарда («матрас») және шыны «клинских матрас» (көлемі 1,5л) ыдыстарда 33-37°C температурада 4-7 тәулікте өсіріп, заманауи биореактор қондырғыларына суспензия түрінде жасалды. Жасуша өсінділері құрамында бұзаудан алынған 10% фетальды қан сарысуы және 100 ЕД/см<sup>3</sup> концентрацияда гентамицин және стрептомицин 100 мкг/см<sup>3</sup>, 3% глютамин және кең спектрлі антибиотиктер, Игла-МЕМ қоректік орталарда өсірілді. Дамылсыз өсетін ВНК-21 жасуша өсіндісінің соңғы концентрациясы 140-200 мың/мл болды.

Криоконсервацияланған ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісін сосуд Дьюарадан -196°C температурадан су моншасына

37±0,5°C салынды. Криопробирканы стерильді жағдайда, жасушаны өсіруге арналған қоректік ортаны қосып, матрастың қақпағын жауып, күн ретін, пассаж № жазып, зарарсыздыққа тексеру үшін ЕПА, ЕПБ және тиогликоль қоректік ортасынан әр қайсысынан жеке-жеке сынама алынды. Нәтижесінде, бактериялық қоректік орта таза, ешқандай жүзінділер жоқ, яғни саңырауқұлақтармен микоплазмадан таза. Жасуша өсіндісінен «моноқабат» алу мақсатында дайын қоректік ортасы ауыстырылды.

*Моноқабатты ВНК-21 жасуша өсіндісінде CVS-11 құтырық вирусын өсіру*

Материалдар +37°C термостатқа 24 сағат (1 тәулік) бақылауға қалдырылды. 24 сағат өткеннен кейін ВНК-21 жасуша өсіндісі микроскоппен бақыланды.

Жасушалар осы уақыт ішінде пролиферацияланып, морфологиялық пішіні өзгеріп, аздаған немесе орташа колониялар түзді.

Құтырық вирусын өсіру арнайы матрастарда жүргізілді. Вирустың өсуі кезінде қоректік орта әртүрлі концентрацияларда қолданылды, яғни ірі қара малдың қан сарысуын қоспастан бұрын - 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 5,0% инактивациясы болды. Құтырық вирусы енгізілгеннен кейін, инфекцияның көбеюі 0,01 - 0,1 ТЦД<sub>50</sub> / жасушаны құрады. Өсіру 37°C температурада 48, 72 және 96 сағат бойы жүргізілді. Вирус құрамындағы суспензия сұйықтығы бөлек плашкаларға құйылып, таңбаланды, биологиялық белсенділігі тексеріліп, қолданылғанға дейін сақталды.

Инфекция қалыптастыру моноқабатты жасуша өсіндісінде жасалды. Жұқтырылған жасушалар стационарлық өсіру әдісімен 30, 33, 35, 37°C температурада инкубацияланды.

Өсіру ұзақтығы вирустың моноқабатының зақымдану қарқындылығымен анықталды, яғни зақымдану кезінде, жасуша моноқабатының 70-80%-нда цитопатогендік әсері көрінді, матрастар -30°C төмен температурада тоңазытылды. Вирусты жуғаннан кейін матрастың құрамында вирус бар материал бір бөтелкеге біріктірілді.

### **Зерттеу нәтижелері**

ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінде CVS-11 құтырық вирусының штаммының өсіру

*Вирустың жұқпалы болуының титрін анықтау*

Вирус құрамындағы материалдың жұқпалы белсенділігі ВНК-21 жасуша өсіндісінде титрлеу, салмағы 10-12 г болатын зертханалық ақ тышқандарға жұқтыру арқылы анықталды. Вирус суспензиясының 10 еселенген ерітіндісі (10<sup>-1</sup>-нан 10<sup>-4</sup>-ға дейін) дайындалды және әр сұйылту 4 зертханалық ақ тышқандарға 0,03 см<sup>3</sup> көлемді доза менинтрацеребральді жұқтырылды. Жануарларға 14 күн бойы бақылау жүргізілді. Инфекция титрінде цитопатиялық әсерінің көрінуі Рид және Менч әдісі бойынша есептелді. Сенімді нәтижелерге қол жеткізу үшін, әр тест материалын қолдана отырып үш пассажда жасалды.

*Штаммды жаңарту және құтырық вирусын дайындау*

Салмағы 10-12 г зертханалық ақ тышқандардағы инфекциялық белсенділікті анықтау үшін супернатант қолданылды. Стерильділігі бактериалды ортаға тиогликоль ортасын қосу арқылы тексерілді.

Кемінде 6.0 IgЛД<sub>50</sub>/мл вирустық инфекцияға қарсы титрі бар мидың суспензиясы құтырыққа қарсы ү-глобулинмен ерекшеленді. Тазартылған церебральды суспензия флаконға құйылып, -40°C температурада тоңазытқышта сақталды. Кәсіпорында CVS-11 штаммы жылына бір реттен жаңартылып отырады.

жағдайларын оңтайландыру бойынша зерттеу жұмыстары жүргізілді. ВНК-21 моноқабатты

жасуша өсіндісінде вирусты жұқтыру 1-2 тәулікте атқарылды. Вирустың өсуі кезінде ірі қара малдың қансарысуы бар Игла-МЕМ

ортасы қолданылды. Инкубация температурасы 37°C болды. Зерттеу нәтижелері (кесте 1) көрсетілді.

Кесте -1 ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісіндісінің құтырық вирусының жинақталу деңгейіне әсері.

Жасуша өсіндісі	Пассаж деңгейі	ЦПӨ көріну мерзімі, тәулік	Вирус титрі, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
ВНК-21	1	4-5	3,25
	2	3-4	4,75
	3	3	5,50

1-кестенің мәліметтерінде көрсетілгендей, құтырық вирусын өсірудің стандартты жағдайында, CVS-11 штаммының мөлшері 3,25 - 5,50 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> мөлшерінде жиналғандығы байқалды. Жұмыстың келесі кезеңінде қоректік ортадағы ІҚМ қансарысуының концентрациясына вирустың жинақталу деңгейінің әсері зерттелді (кесте 2).

Кестеде көрсетілгендей қасиетін ұстап тұрушы қоректік ортасындағы қан сарысуы пайызының құтырық

вирусының жинақталу деңгейіне әсері кезінде, алынған вирус 0,5% пайдаланылған, сондай-ақ сарысуы жоқ екендігі де көрсетілген. Ірі қара малдың қансарысуындағы 1,0% -дан 2,0% -ға дейінгі көмекші ортасындағы ЦПӨ көрінісі үшін инфекцияланған моноқабатта жаппай зақымданулар болды. Кейбір әдебиеттерде сүйенсек, құтырық вирусы аз қансарысу медиасын қолдана отырып сәтті өсірілетіндігі айтылған [13, с. 3-6].

Кесте -2 Қоректік ортадағы қан сарысуы пайызының құтырық вирусының жинақталу деңгейіне әсері.

Пассаж деңгейі	Вирус титрі, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> ірі қара малдың қансарысуының пайыздық мөлшері мен қоректік ортасы					
	0,0 %	0,5%	1,0%	2,0%	3,0%	5,0%
1	3,25	3,25	5,25	5,00	4,25	4,50
2	3,25	3,50	5,75	5,25	4,50	4,75
3	3,50	3,75	6,00	5,50	4,75	5,00

Қоректік ортаға қан сарысуын қосу вирустың көбірек қорғалуын қамтамасыз етеді, сонымен қатар вирустың репликациясының компоненттерімен толықтырылады. Қазіргі уақытта қан сарысуы төмен

медианы пайдалану өзекті болып келеді, бұл оның жасуша өсіндісінде цитотоксикалық деңгейін төмендетеді және сарысу ақуыздарының ғылыми зерттеулер нәтижелеріне әсерін жояды. Қазіргі

таңда ірі қара малдың қан сарысуы бар ұстап тұрушы қоректік ортасы қолданылды. Яғни, бұл вирустың жоғары титрлерін алуға мүмкіндік беретінін көрсетті. ВНК-21 жасуша

өсіндісінде құтырық вирусының максималды жинақталуының оңтайлы температуралық режимін анықтау үшін 30, 33, 35, 37°C температурада өсірілді (кесте 3).

Кесте -3 Әр түрлі температуралық жағдайда ВНК-21 жасуша өсіндісінде құтырық вирусын көбейту.

Температура (°C)	Өсіру ұзақтығы (күн)	Пассаж деңгейі	Вирус титрі lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
+30	6-8	1	3,25
		2	4,25
		3	4,75
+33	7-8	1	4,00
		2	4,50
		3	5,00
+35	5-6	1	5,25
		2	5,50
		3	5,75
+37	4-6	1	5,25
		2	6,00
		3	6,25

3-кестенің мәліметтерінен CVS-11 құтырық вирусының штаммының ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінде 37°C температурада мүмкіндігінше жиналғанын көруге болады. Вирус жинақталуының 30, 33°C температурада төмендеуі байқалды. Вирустың 37°C температурада өсу ұзақтығы 4-6 тәулікті құрады. 30-33°C температурада вирус өсіру уақыты орта есеппен 1-2 күнге өсті және бүкіл өсіру кезеңінде жасуша қабаты нашарламады. инкубацияның 4-6-ші күнінде моноқабатта вируспен толық зақымдануы 35, 37°C температурада байқалды.

Құтырық вирусының CVS-11 штаммын ВНК-21 жасуша өсіндісіне жұқтыру ортасы арнайы матростарға тікелей енгізу арқылы жүргізілді. Инфекция үшін 5,5-6,0 lgТЦД<sub>50</sub>/мл жұқпалы белсенділік титрі бар вирус қолданылды. Жасушалар 37°C температурада 9 тәулік инкубацияланды. Вирустық өнім 3, 4 және 5 тәуліктік өсіруден кейін жиналды. Жасуша өсіндісінің бір сериясын қолдана отырып, вирусты бірнеше рет алуға болады, өйткені құтырық вирусын сұйықтыққа шығару жасушаларға аз ғана зиян келтіреді. Тәжірибе нәтижелері 4-кестеде келтірілді.

Кесте - 4 Құтырық вирусының «CVS-11» штаммын жасуша өсіндісіне жұқтыру.

Көрсеткіштер	Жасуша өсіндісі параметрлері
--------------	------------------------------



Толық моноқабат алу уақыты	1-2
Жасуша өсіндісін оңтайлы өсіру уақыты (күн)	2-3
Жасуша өсіндісін өсіру шарттары (рН мәні)	7,2-7,4
Өсу температурасы (°С)	37,0-37,5
Инфекциялық титрі (Ig ЛД <sub>50</sub> /мл)	6,0

Көрсетілген параметрлермен вирус жұқпалылығының титрі 6,0 Ig ЛД<sub>50</sub>/мл 4-кестеден көруге болады. CVS-11 штаммынан инактивацияланған вакциналарды алу үшін вирус антигенін 3-5 рет шоғырландыру қажет, содан кейін вакцинаны инактивациялау және дайындау керек болады.

5).

Зерттеу барысында алынған құтырық вирусына сезімтал ВНК-21 (мексикалық сублиния) жасуша өсіндісілерінің жүйесіне CVS-11 құтырық вирусты штаммын өсірудің әртүрлі әдістерінің параметрлері көрсетілді (кесте

Кесте – 5 Құтырық вирусының CVS-11 штаммын өсіру параметрлері.

Көрсеткіштер	Жасуша өсіндісінің параметрлері	
	стационарлық	суспензиялық
Егуконцентрациясы (мың / мл)	140 - 200	140 - 200
Моноқабаталууақыты (сағ)	24	24
Жасуша өсіндісін оңтайлыөсірууақыты (сағ)	48	48
Жұқтыру дозасы (ЛД <sub>50</sub> / кл)	0.01-0.1	0.01-0.1
Жасуша өсіндісін өсірушарттары (рН мәні)	7,2 + 0,08	7,2 ± 0,08
Жасуша өсіндісітемпературасы (°С)	36,75 ±0,125	36,75 ±0,125
Инфекцияныңвирустықтитрі (IgЛД <sub>50</sub> /мл) M ± m	6,10 + 0,28	6,25 ±0,35

Кестеде келтірілген зерттеулер нәтижесінде, вирусты өсіру үшін ең қолайлы температура 36,5-37,0°С, ал сілтілі орта (рН мәні 7.0-7.4) екендігі байқалады. Вирустың максималды жинақталуы 0,01-0,1 ТЦД<sub>50</sub>/мл инфекциялық дозада, ал суспензиямен өсіру кезінде 0,1-0,5 ТЦД<sub>50</sub>/мл моноқабатта пайда болды.

Вирустың жинақталуы жасушалардың тұтастығын бұзбай жүреді, сондықтан моноқабат өсіру кезінде жасушалардың оңтайлы концентрациясы 140-200 мың/мл, ал суспензиямен өсіру кезінде - 700-1000 мың/мл болды. Зерттеу тәжірибелерімізде құтырық вирусының CVS-11 штаммын

моноқабатта өсіру тұрақты түрде 6.00-6.50 IgТЦД<sub>50</sub>/мл құрады, ал суспензиямен өсіру кезінде - 6.80-7.00 IgТЦД<sub>50</sub>/мл мөлшерінде жиналатындығы анықталды.

Вирустың өсу кезеңіне байланысты CVS-11 құтырық вирусты суспензиясының жинақталу

динамикасын анықтау үшін зерттеулер (6 кесте) берілді, нәтижелерден көріп отырғанымыздай, жұқтыру титрі 48 сағаттық өңдеуден кейін максималды 6,50 Ig ЛД<sub>50</sub>/мл деңгейіне жетті.

Кесте - 6 Дамылсыз өсетін ВНК-21 жасуша өсіндісіне құтырық вирусының жинақталу динамикасы.

Жасуша өсіндісі	Өсу уақыты (сағ)	Жұқтыру титрі(IgЛД <sub>50</sub> /мл)
ВНК-21	0	3,73 ± 0,30
	20	5,25 ± 0,09
	25	6,13 ± 0,35
	48	6,50 ± 0,15
	72	6,25 ± 0,23
	96	6,0 ± 0,28

### Қорытынды

CVS-11 штаммынан, экологиялық таза және жоғары тиімді инактивацияланған құтырыққа қарсы вакциналар жасалады, олар қарқынды және ұзаққа созылған иммунитетті тудырады және қамтамасыз етеді жануарларды жоғары вирустық құтыру вирусымен тікелей жұқтырудан қорғайды.

Құтырық вирусының CVS-11 штаммды суспензиясын қолдана отырып, ВНК-21 жасушаөсіндісінде жақсы өсірілгені және суспензия жасушаларында өскенде көлемді болатындығы және вакцина жасау үшін қажетті вирус мөлшері анықталды.

CVS-11 құтырық вирусының штаммын дамылсыз өсетін ВНК-21 жасуша өсіндісінде 1,0% ірі қара малдың қан сарысуымен, 37°C температурада, өсіру кезеңі 4-6 күн

болатын оңтайлы параметрлері анықталды.

Құтырық вирусының CVS-11 штаммын моноқабатта өсіру және жасуша өсіндісінің суспензиясын өсірудің оңтайлы жағдайлары жасалды, суспензия өсіндісінде құтырық вирусының максималды жинақталуы 48 сағатта, ал моноқабатта - 72 сағатта болатындығы көрсетілді.

ВНК-21 дамылсыз өсетін жасуша өсіндісінің бастапқы концентрациясы 1 млн/мл болған кезде CVS-11 штаммы үшін вирустық суспензиядағы инфекцияның дозасы 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/мл құрайтындығы дәлелденді.

Жүргізілген тәжірибелер көрсеткендей, құтырық вирусының CVS-11 штаммын өсіру кезінде вирус 5,25- 6,25 ТЦД<sub>50</sub>/мл титрінде тұрақты түрде жиналды.

Нәтижесінде, CVS-11 құтырық вирусының штаммын өсіруді оңтайландыру, вирус құрамындағы суспензиялардың титрін арттыруға мүмкіндік берді. Құтырық вирусын өсірудің параметрлерін қолдана отырып, алынған вирусы бар суспензиялардың титрлері дамылсыз

өсетін жасуша өсінділерінде өсірілген басқа да вакциндік штаммдардың титріне сәйкес келетінін және тиімді ветеринарлық препараттарды әзірлеу үшін қажет екені белгілі болды.

### Әдебиеттер тізімі

1. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. - Москва: Аквариум, 2001. – С. 303.
2. Джупина СИ., Завадских А.В. Клиническое проявление бешенства у животных //Ветеринария. - 2002.-№2.-С.9-10.
3. Борисов А.В., Метлин А.Е., Домский И.А., Михалишин В.В., Рыбаков С.С. Оценка эффективности иммунизации диких животных оральной антирабической вакциной//Современные проблемы природоиспользования, охотоведения и звероводства: Матер. Междунар. науч.-практ. конф.- Киров,2002.- С.543-545.
4. Евсеева С.Д., Хрипунов Е.М., Окрошидзе М.Г. Требования к оральным антирабическим вакцинам и приманкам // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Матер. Междунар. науч.-практ. конф., Покров, 2002. - С. 110-111
5. Кузнецов П.П., Иванов В.С., Кузнецова СВ. Антирабическая вакцина из фиксированного штамма вируса бешенства, адаптированного к перевиваемой линии клеток ВНК-21 // 21-й Всемирный вет. конгресс. - Москва.: 1979. - С 38
6. Бурлаков С.В. Профилактика бешенства // Ветеринария. - 2002.-№2.- С.8-9.
7. Meeting report An important date in rabies history Vaccine 25 (2007) с. 8647–8650
8. Annette I., Isabelle D.L., Bernadette A.R.Global characteristics of the rabies biologics market [Электрон.ресурс]. – 2017. URL: [www.elsevier.com/locate/vaccine\\_2017.htm](http://www.elsevier.com/locate/vaccine_2017.htm) (дата обращения: 12. 10.2018).
9. Printed in Great Britain Antigenic Sites on the CVS Rabies Virus Glycoprotein: Analysis with Monoclonal Antibodies//*J. gen. Virol.* 1983, № 64,p843-851
10. Generation of Recombinant Rabies Virus CVS-11 Expressing eGFP Applied to the Rapid Virus Neutralization Test *Viruses* 2014, Article 6(4), 1578-1589.
11. Иманбекова Т.А., Ахметсадыков Н.Н., Ажмухан Н.О., Маукиш А.К. Культуральные свойства клеток, продуцирующих вирус лейкоза крупного рогатого скота // «Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты». №4 (72) 2016 ISSN 2304-3334-04 – С.37-38
12. Кутумбетов Л.Б., Мырзахметова Б.Ш., Шманов Г.С // Чувствительность первичных культур клеток из почек и тестикул ягнят и козлят к вирусу

нодулярного дерматита // «Изденістер, нәтижелер – Исследования, результаты». №4 (80) 2018. ISSN 2304-3334. – С. 12-13

13. Абдуалиева А.А., Ахметсадықов Н.Н., Батанова Ж.М., Абдел З.Ж., Иманбекова Т.А.// Құтырық вирусы CVS-11 штаммына сезімтал жасуша өсіндісінің жүйесін таңдау//Изденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. №1 (81) 2019. ISSN 2304-3334. – С. 3-6

## References

1. Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. Beshenstvo zhivotnykh // M.: "Akvarium", 2001. – 303p.

2. Dzhupina S.I., Zavadskikh A.V. Klinicheskoye proyavleniye beshenstva u zhivotnykh //Veterinariya, 2002.-№2.-p.9-10.

3. Borisov A.V., Metlin A.Ye., Domskiy I.A., Mikhailishin V.V., Rybakov S.S. Otsenka effektivnosti immunizatsii dikikh zhivotnykh oral'noy antirabicheskoy vaksinoy//Sovremennyye problemy prirodno ispol'zovaniya, okhotovedeniya i zverovodstva: Mater. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf.- Kirov, 2002.- p.543-545.

4. Yevseyeva S.D., Khripunov Ye.M., Okroshidze M.G. Trebovaniya k oral'nym antirabicheskim vaksinam i primankam // "Biologoekologicheskiye problemy zaraznykh bolezney dikikh zhivotnykh i ikh rol' v patologii s.-kh. zhivotnykh i lyudey".: Mater. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. - Pokrov, 2002. - p. 110-111.

5. Kuznetsov P.P., Ivanov B.C., Kuznetsova S.V. Antirabicheskaya vaksina iz fiksirovannogo shtamma virusa beshenstva, adaptirovannogo k perivivayemoy linii kletok VNK-21 // 21-y Vsemirnyy vet. kongress. - M.: 1979. - p 38

6. Burlakov S.V. Profilaktika beshenstva-Veterinariya, 2002.-№2.-p.8-9.

7. Meeting report An important date in rabies history Vaccine 25 (2007) p. 8647–8650

8. Annett I., Izabel' D.L., Bernadett A.R. Global'nyye kharakteristiki rynka biopsii ot beshenstva [Elektron. resurs]. - 2017. USA: [www.elsevier.com/locate/vaccine\\_2017.htm](http://www.elsevier.com/locate/vaccine_2017.htm) (data obrashcheniya: 12. 10.2018)

9. Printed in Great Britain Antigenic Sites on the CVS Rabies Virus Glycoprotein: Analysis with Monoclonal Antibodies //J, gen. Virol. (1983), 64, 843-851.

10. Generation of Recombinant Rabies Virus CVS-11 Expressing eGFP Applied to the Rapid Virus Neutralization Test Viruses 2014, Article 6(4), 1578-1589.

11. Imanbekova T.A., Akhmetzadykov N.N., Azhmukhan N.O., Maukish A.K. Kletochnyye svoystva kletok, vyzyvayushchikh virusnuyu leykemiya u samogo krupnogo telenka s izvestnymi kletkami // Izdenister, nәtiјeler – İssledovaniya, rezvltatı. №4 (72) 2016 ISSN 2304-3334-04 - 37-38 p.

12. Kutumbetov L.B., Myrzakhmetova B.SH., Shmanov G.S. // Chuvstvitel'nost' pervichnykh kletok kletki i koagulyatsiya uzlovogo dermatita // Izdenister, nәtiјeler – İssledovaniya, rezvltatı. №4 (80) 2018. ISSN 2304-333 4 -12-13 p.

13. Abdualiyeva A.A., Akhmetzadykov N.N., Batanova ZH.M., Abdel' Z.ZH., Imanbekova T.A. // Qutırıq vırwsı CVS-11 ştamına sezimtal torşa ösindisiniń jüyesin tańdaw // Izdenister, nәtiјeler – İssledovaniya, rezvltatı. №1 (81) 2019. ISSN 2304-3334. – p. 3-6

## ОПТИМАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «CVS-11»

*А.А. Абдуалиева<sup>1</sup>, Н.Н. Ахметсадықов<sup>1</sup>,  
К. Д.Кулманбетов<sup>2</sup>, Т.А.Иманбекова*

*<sup>1</sup>Казахский Национальный Аграрный Университет, <sup>2</sup> ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген»*

### **Резюме**

Одна из актуальных проблем ветеринарной биотехнологии, которая требует четкого решения технологических производства вакцин (отбор штаммов, адаптация к росту, методы выращивания, биопрепараты) как отечественного продукта в сельском хозяйстве.

При выборе вакцины особое внимание уделяется безопасности препарата и продолжительности иммунитета у животных. Для производства вакцины требуется штамм вируса имеющей высокие иммуногенные свойства, также способные сохранять эти свойства в периоды выращивания и хранения.

Для получения инактивированной вакцины используются различные инактиванты и выбирается оптимальные условия для инаktivации.

В таких случаях вирус должен полностью потерять свои инфекционные свойства и увеличить антигенность. Вышеупомянутые проблемы являются актуальными и являются ключевой предпосылкой для исследования развития технологии производства антирабических вакцин.

**Ключевые слова:** CVS-11, ВНК-21, культура клеток, монослой, вирус, зооноз, бешенство, пассаж, вакцина, инаktivация, суспензия, титрование, антитело, антиген.

## OPTIMAL PARAMETERS CULTIVATION RABIES VIRUS STRAIN «CVS-11»

*A.A. Abdualieva<sup>1</sup>, N.N. Akhmetsadykov<sup>1</sup>,  
K. D. Kulmanbetov<sup>2</sup>, T.A. Imanbekova<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Kazakh National Agrarian University, <sup>2</sup>Scientific-Production Enterprise «Antigen»*

### **Summary**

One of the urgent problems of veterinary biotechnology, which requires a clear solution to the technological production of vaccines (selection of strains, adaptation to growth, growing methods, biological products) as a domestic product in agriculture.

When choosing a vaccine, special attention is paid to the safety of the drug and the duration of immunity in animals. For the production of vaccines, a strain of the virus having high immunogenic properties is required, which are also capable of retaining these properties during periods of cultivation and storage.

To obtain an inactivated vaccine, various inactivants are used and the optimal condition for inactivation is selected.

In such cases, the virus should completely lose its infectious properties and increase antigenicity. The above problems are relevant and are a key prerequisite for research on the development of technology for the production of rabies vaccines.

**Key words:** CVS-11, BHK-21, cell culture, monolayer, virus, zoonosis, rabies, passage, vaccine, inactivation, suspension, titration, antibody, antigen.