

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы** (пәнаралық) = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2019. - №3 (102). - С.223-231

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИМЕРЭТИЛЕНИМИНА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «VRC-RZ2»

*Ж.Б.Кондибаева, К.Д., Жугунисов
Н.К. Далбаев, З.Д. Ершебулов, Е.А. Булатов
РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности» КН МОН РК, п.г.т. Гвардейский*

Аннотация

В данной работе представлены результаты исследований инактивации вируса бешенства с использованием инактиванта димерэтиленимина с отработкой параметров инактивации. Установлено, что оптимальными параметрами инактивации вируса бешенства штамма «VRC-RZ2» являются конечная концентрация инактиванта 0,2%, температура реакционной среды 37°C, продолжительность инактивации 24 часа. Разработанный режим инактивации полностью разрушает инфекционные свойства вируса бешенства, сохраняя при этом высокую антигенную активность. Определение на остаточную вирулентность проводили на культуре клеток ВНК-21/13 в течение 3-х последовательных пассажей. Результаты проведенных исследований показали, что при инфицировании культуры клеток ВНК-21/13 инактивированной суспензией вируса в течение 10 сут наблюдения не отмечено проявления деструктивных изменений монослоя при трехкратном последовательном пассировании. При изучении авирулентности инактивированных материалов на 3-5 дневных мышатах-сосунах они остались живыми, без проявления каких либо клинических признаков болезни на протяжении всего срока наблюдения (10 сут). Полученные результаты свидетельствовали о том, что исследованные пробы являлись авирулентными.

Исходя из вышперечисленного следует, что ДЭИ эффективен при инактивации вируса бешенства и рекомендуется для широкого использования в производстве инактивированных вакцин против бешенства

Ключевые слова: вирус, штамм, бешенство, инактивант, димерэтиленимин, культура клеток, ИФА, антигенная активность.

Введение

Бешенство - это одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний вирусной природы, протекает с тяжелым поражением центральной нервной системы и заканчивается, как правило, смертельным исходом [1]. В настоящее время в Республике Казахстан сложилась напряженная эпизоотическая ситуация по бешенству животных, имеющим социально-экономическое значение. На сегодняшний день проблемной и актуальной инфекцией для Казахстана и Европейских стран по-прежнему остается вирус бешенства [2, 3]. Поэтому борьба с ним предоставляется не только экономической, но социальной проблемой, успешное решение которой в значительной мере зависит от качества антирабических вакцин, применяемых с профилактической целью [4, 5].

В Казахстане производятся и применяются только диагностические наборы при бешенстве в реакции преципитации и иммунофлюоресценции, а для профилактики бешенства животных применяются зарубежные вакцины.

В связи с этим разработка и производство культуральной вакцины для инъекционного применения против бешенства животных в Республике Казахстан является актуальным. Важным условием эффективности инактивированных вакцин является количество и качество вирусного антигена, выбор инактиванта и оптимальных условий инактивации, позволяющих полностью лишить вирус инфекционности при максимальном сохранении

антигенной активности [6, 7]. На сегодняшний день в производстве инактивированных препаратов, ввиду простоты и надежности технологического процесса инактивации, широко используются химические соединения. Среди большого разнообразия химических инактивантов наиболее широкое применение нашли формальдегид, димер этиленмина (ДЭИ) и бета-пропиолактон (БПЛ), которые на протяжении многих лет используются в производстве вакцин как ветеринарного, так и медицинского назначения [8, 9].

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что подбор наиболее эффективных инактивантов остается одним из актуальных вопросов в производстве эффективных вакцин против бешенства [10, 11]. В таких случаях вирус должен полностью утрачивать свои инфекционные свойства и максимально сохранять антигенность. На процесс инактивации влияют следующие факторы: концентрация инактиванта, время инактивации и температура реакционной среды. Необходимо подобрать оптимальные «щадящие» условия инактивации, при которых не снижается исходная антигенная активность возбудителя, а инфекционная активность полностью утрачивается. В настоящее время производные азиридинов признаны инактивантами, в наибольшей степени отвечающими требованиям безопасности вакцин и рекомендованы МЭБ к применению. Такие производные азиридинов, как аминокэтиленимин (АЭИ),

аминоэтилэтилен (АЭЭИ), бинарный этиленимин (БЭИ), димерэтиленимин (ДЭИ) и другие оказались наиболее эффективными при изготовлении инактивированных вакцин против некоторых болезней, в том числе против бешенства. В сравнительном аспекте, по результатам ранее проведенных исследований, среди указанных химических веществ более щадящим инактивантом для

Материалы и методы

В опытах использовали осветленную культуральную суспензию штамма «VRC-RZ2» фиксированного вируса бешенства, с биологической активностью $7,50 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$ и антигенной активностью в ИФА $8 \log_2$, выращенного в монослойной культуре клеток ВНК-21/13 (перевиваемая линия клеток почки новорожденного сирийского хомячка).

Инактивацию вируса проводили при различных температурах ($20 \pm 0,5$) °С и ($37 \pm 0,5$) °С с инактивантом ДЭИ (15%) (ООО НПП «Биохимресурс» г.Владимир). Рабочий раствор инактиванта (8%) готовили из коммерческого препарата ДЭИ. Конечная концентрация инактиванта в вирусосодержащей суспензии составляла 0,1, 0,2 и 0,3%. Проверку процесса инактивации проводили отбором образцов проб через каждые 2 часа в течение всего периода инактивации для определения снижения инфекционной активности вируса и оценки сохранности антигена. Остаточное содержание ДЭИ в пробах нейтрализовали путем

вируса бешенства являлся ДЭИ [12, 13].

Целью настоящих исследований было изучение инактивирующего действия ДЭИ на вирус бешенства (концентрации инактиванта, температуры, продолжительности процесса инактивации) и влияния данных параметров на антигенные свойства вируса.

добавления 25% рабочего раствора тиосульфата натрия в конечной концентрации 0,25%. Полноту инактивации вируса проверяли на 2-суточном монослое культуры клеток ВНК-21 путем трехкратного пассирования и интрацеребральным заражением мышат-сосунов 3-5 сут возраста. Авирулентными считали инактивированные суспензии, из которых вирус не проявлял цитопатическое действие при пассировании в культуре клеток ВНК-21.

Инфекционную активность вируса определяли методом титрования на белых мышах массой 10-13 г. Для этого готовили десятикратные разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-6} , которые интрацеребрально вводили по 0,03 мл каждой группе мышей (по 4 головы в группе). За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 сут. Инфекционная активность вируса определялась по общепринятой методике с учетом результатов титрования по методу L.Reed и H.Muench [14], выраженным в $\text{Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Антигенную активность вируса бешенства определяли в

твёрдофазном иммуноферментном анализе (ТФ-ИФА) и выраженным в

\log_2 [15].

Результаты исследований

Результаты инаktivации ДЭИ вируса бешенства в конечных концентрациях 0,1, 0,2 и 0,3% при

температурах $(20 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ представлены на рисунках 1, 2.

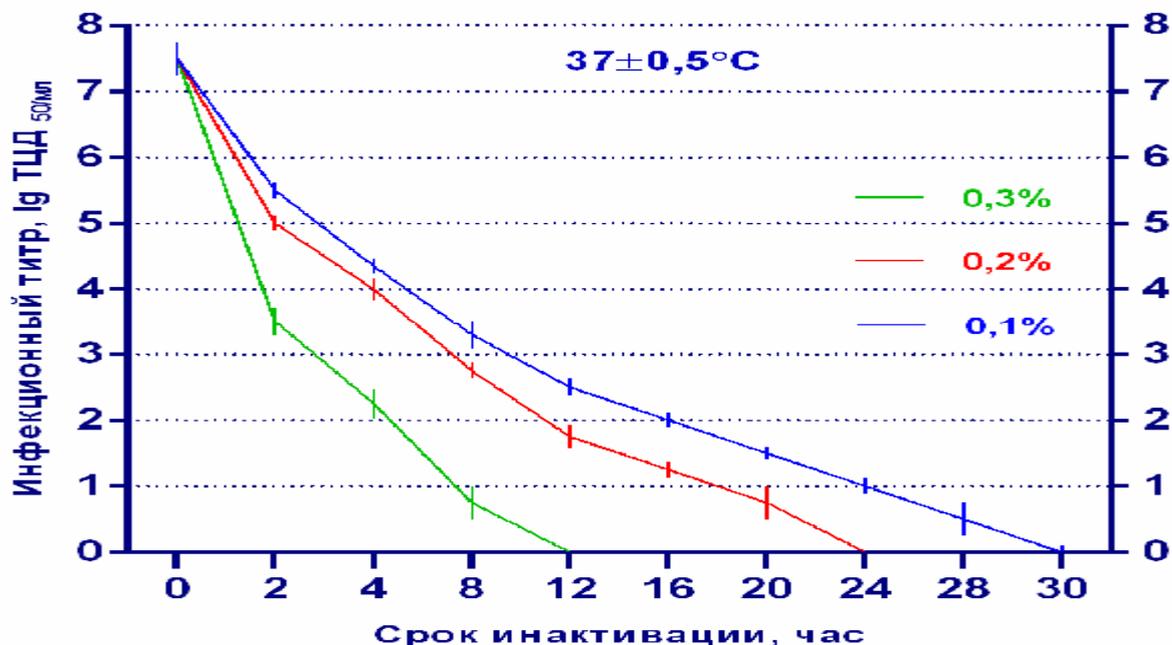


Рисунок 1 – Кинетика инаktivации вируса бешенства при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

Из рисунка 1 видно, что полная потеря инфекционной активности вируса при инаktivации ДЭИ в конечных концентрациях 0,1,

0,2 и 0,3% при температуре 37°C наступает на 30, 24 и 12 ч, соответственно.

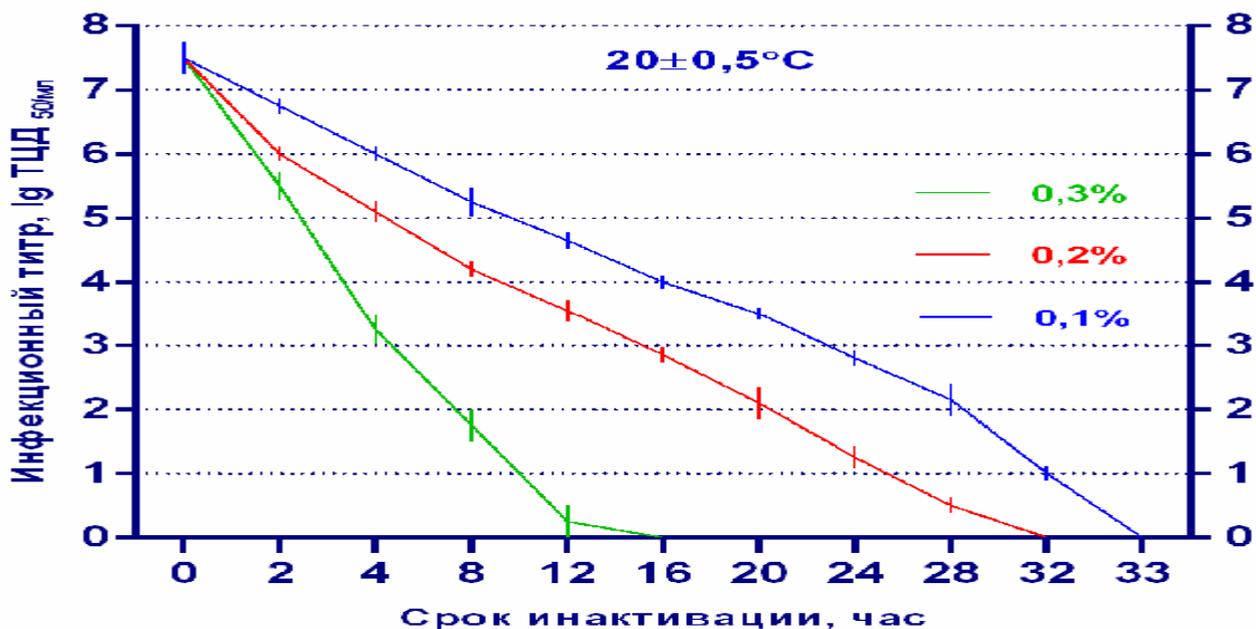


Рисунок 2 - Кинетика инактивации вируса бешенства при температуре (20±0,5) °С

Как видно из рисунка 2, при воздействии 0,3% концентрации инактиванта в течение 16 ч происходит полная инактивация инфекционной активности вируса

бешенства, а при концентрации ДЭИ 0,1% - за 33 ч.

Результаты определения активности антигена вируса бешенства, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Определение активности вируса бешенства при инактивации ДЭИ X±m, n=3

Т°С	Продолжительность инактивации, час	Концентрация инактиванта, %	Активность антигена ТФ-ИФА, log ₂	Остаточная инфекционная активность, (lg ТЦД ₅₀ /см ³)
20	12	0,1	9	6,75±0,02
		0,2	9	5,50±0,14
		0,3	7	4,50±0,00
	24	0,1	7	4,00±0,12
		0,2	8	3,50±0,05
		0,3	7	2,50±0,25
	30	0,1	7	2,00±0,00
		0,2	8	1,50±0,12
		0,3	7	1,00±0,25
37	12	0,1	7	4,00±0,10
		0,2	9	3,00±0,12
		0,3	7	2,00±0,12

24	0,1	8	1,00±0,05
	0,2	8	0,00
	0,3	7	0,00
30	0,1	8	0,00
	0,2	8	0,00
	0,3	7	0,00

Из полученных результатов, представленных в таблице 1, видно, что активность антигена вируса бешенства при инактивации ДЭИ в конечной концентрации 0,2% вне зависимости от температурных условий сохранялась максимально в течение всего срока наблюдения в титре 8-9 \log_2 соответственно. В концентрациях (0,1%) и (0,3%) ДЭИ при всех испытанных температурных режимах антигенная активность вируса снижалась на 2-3 порядка и составляла 7-8 \log_2 .

Анализируя приведенные данные, можно отметить, что ДЭИ в концентрации 0,2% при температуре ($37\pm 0,5$) °С в течение 24 ч полностью разрушает инфекционные свойства вируса бешенства, сохраняя при этом антигенную активность. Инфекционная активность вируса в контроле (без инактиванта) в течение 12 ч инкубирования при температуре ($37\pm 0,5$) °С снизилась на $0,25\pm 0,01$ lg ТЦД₅₀/см³, при температуре ($20\pm 0,5$) °С титр вируса оставался на исходных уровнях. Антигенная активность вируса в контрольных пробах в процессе

всего периода инактивации оставалась на исходном уровне.

Определение на остаточную вирулентность проводили на культуре клеток ВНК-21/13 в течение 3-х последовательных пассажей.

Результаты проведенных исследований показали, что при инфицировании культуры клеток ВНК-21/13 инактивированной суспензией вируса в течение 10 сут наблюдения не отмечено проявления деструктивных изменений монослоя при трехкратном последовательном пассировании. Далее определяли авирулентность инактивированных материалов на 3-5 дневных мышатах-сосунах путем интрацеребрального заражения в дозе 0,03 см³.

В результате проведенных экспериментов все инфицированные мышата-сосуны остались живыми, без проявления каких либо клинических признаков болезни на протяжении всего срока наблюдения (10 сут). Полученные результаты свидетельствовали о том, что исследованные пробы являлись авирулентными.

Обсуждение результатов

Одним из основных и эффективных способов предотвращения бешенства является своевременная и эффективная иммунопрофилактика, основанная

на использовании антирабических вакцин [16]. С момента создания Л.Пастером первой антирабической вакцины прошло более 100 лет. В распоряжении ветеринарной

практики имеются разные типы антирабических препаратов, обеспечивающие защиту животных от летальной инфекции, однако наибольшее распространение получили инактивированные вакцины. Они высокоэффективны, обладают экономически обоснованной простой технологией изготовления. Использование описанных препаратов и внутримышечное их применение будет способствовать снижению напряженности эпизоотической ситуации по бешенству [17, 18].

Одной из главных проблем получения высокоэффективных инактивированных вакцин является изыскание безупречного способа инактивации вируса, обеспечивающего необратимое повреждение его репликативного механизма при полном сохранении исходной антигенной структуры. Результаты литературного анализа позволили нам в качестве наиболее перспективного и эффективного химического соединения для инактивации вируса бешенства выбрать ДЭИ [19, 20, 21, 22].

Аналогичные исследования были проведены Mondal et. all [23], которые использовали ДЭИ в концентрации 1,6 mM в течение 24 ч при $(37\pm 0,5)$ °C для инактивации вируса бешенства. Инактивация вируса ДЭИ дала возможность получить безопасные и иммуногенные препараты против этой болезни.

Пуревхуу и др [4] проводили исследования по инактивации вируса бешенства аминокислотами и В-пропиолактоном, при температуре 4,

18 и 37°C в течение 24 часов. Конечная концентрация инактивантов в исследованных препаратах составила 0,05; 0,025 и 0,0125%. Результаты этих исследований показали, что АЭИ и БПЛ являются эффективными инактивантами для вируса бешенства.

В Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности в 2002 году был получен вакцинный штамм «VRC-RZ2» вируса бешенства, адаптированный к репродукции в культуре клеток ВНК-21.

С этой были проведены исследования по инактивации указанного штамма вируса бешенства ДЭИ в разных концентрациях и при различных температурных режимах. В результате проведенных работ установлено, что ДЭИ в концентрации 0,2% при температуре $(37\pm 0,5)$ °C в течение 24 ч полностью разрушает инфекционные свойства вируса бешенства, сохраняя при этом его антигенную активность. Результаты иммунобиологических характеристик данного штамма вируса позволили рассматривать его в качестве вакцинного кандидата для изготовления профилактических препаратов против бешенства животных.

На его основе была изготовлена микросерия антирабической культуральной инактивированной вакцины в жидкой форме. Разработанная нами технология позволила получить вирусный материал с высокой инфекционной активностью - 7,50 lg

ТЦД₅₀/см³ и с антигенной активностью инаktivированного материала до 8 log₂ в ИФА. Привитой данной вакциной у кроликов и собак создавался напряженный иммунитет, который формировался на 14-21 сутки и сохранялся в течение 9 мес, что определяли путем контрольного заражения животных вирулентным референс-штаммом вируса бешенства.

Проведенные исследования показали, что ДЭИ удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к инаktivантам и может быть использован для инаktivации вируса бешенства с целью изготовления вакцины. Инаktivация в этом случае достигается значительно быстрее, чем с использованием других инаktivантов, что связано с изменением структур оснований нуклеиновых кислот вирусов. Этиленмин легко проходит через

белковую оболочку вируса, не разрушая ее структурных компонентов. В этот период препарат утрачивает инфекционность, но полностью сохраняет антигенную структуру. Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что в результате проведенных исследований разработан метод инаktivации вируса бешенства при помощи ДЭИ, позволяющий получать высокоиммуногенный антиген. В ходе проведенного исследования было установлено, что инаktivация вируса в суспензиях достигается при концентрации 0,2% ДЭИ, температуре (37±0,5) °С в течение 24 час. При этом полностью разрушена инфекционная активность вируса бешенства, тогда как антигенная активность вируса оставалась на исходном уровне в течение всего срока инаktivации.

Вывод

В данной работе показаны результаты исследований динамики инаktivации вируса бешенства с учетом влияния различных концентраций ДЭИ, температуры и времени инаktivации на инфекционную и антигенную активность вируса бешенства.

По результатам проведенных исследований установлено, что оптимальными параметрами инаktivации вируса бешенства являются: конечная концентрация инаktivанта 0,2%, температура реакционной среды (37±0,5) °С, продолжительность инаktivации 24 час. При данном режиме инаktivации сохраняются антигенные свойства вируса бешенства, что отражается на качестве и эффективности вакцин.

Исходя из вышеперечисленного следует, что ДЭИ эффективен при инаktivации вируса бешенства штамм«VRC-RZ2» и рекомендуется для широкого использования в производстве инаktivированных вакцин против бешенства.

Список литературы

1. Кузнецов П.П., Таршис М.Г. Бешенство животных. М., 1981. - С.56.

2. Батанова Ж.М., Әбдіқадырова Ә.М., Ахметсадыков Н.Н. Қазақстан Республикасындағы құтырықтың індеттік жағдайы. Научно-практический журнал «Ветеринария». - № 2 (18).- 2011. - С. 35-39.
3. Абдрахманов С.К., Есенбаев К.К., Дюсембаев С.Т. Эпидемиологическая ситуация бешенства в Республике Казахстан // Молодой ученый. - 2017. - №6.1. - С.1-4.
4. Пуревху Ц. Культуральная инактивированная вакцина против бешенства из штаммов «ВНИИЖ» и «ЕРА»: автореф. дис.. канд. вет. наук. – Владимир, 2005. - С.21-22.
5. Комитет экспертов ВОЗ по бешенству: 8-й доклад. - Женева: ВОЗ, 1994. - 117 с.
6. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов: 31-й доклад. - Женева: ВОЗ, 1983. - 327 с.
7. Иванов В.С., Скичко Н.Д. Разработка и внедрение в промышленное производство и ветеринарную практику России культуральных инактивированных вакцин против бешенства. Тез. докл. науч.-производ. конф., 27-30 августа 1996 г., - Курск, 1996, - С.126-128.
8. Кондибаева Ж.Б., Хайруллин Б.М. и др. Сравнительное изучение инактивации вируса болезни Ауески димером этиленмина и формальдегидом // Казахский агротехнический университет им С.Сейфуллина Журнал Вестник науки №4 - Астана, 2011 г. С.9-14.
9. Zhugunissof K., Bulatov Ye., Taranov D., Yershebulov Z., Koshemetov Zh., Zhunushov A., Renukaradhya G., Tabynov K., Abduraimov Ye. 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 // Veterinary Microbiology. – 2018. – 226. – P. 23-30 (Elsevier)
10. Гочмурадов М.Г. Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: - Владимир, 1999. -33 с.
11. Вишняков И.Ф., Никишин И.В., Недосеков В.В. и др. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства // Ветеринария. - 1998. - №1. - С.22-25.
12. Сливко И.А., Недосеков В.В., Хрипунов Е.М. и др. Изучение условий культивирования и инактивации вируса бешенства // Матер. междунар. науч.-практ. конф. - Покров, 2001. - С. 68-70.
13. Вишняков И.Ф., Никишин И.В., Недосеков В.В., Горшкова Т.Ф., Жестерев В.И., Шевченко А.А., Зуев В.В., Груздев К.Н. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства животных // Ветеринария. - 1998.- № 6. - С.76-80.
14. Reed L., Muench H. A simple's method of estimation fifty percent and pints. // J. Amer. Hyg.1938. -V.27.- P.493-497.
15. Ст 405-1919-04 гп-099-2017 Тест-система для диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа.

16. Шипилов В.И., Дудников С.А. Усовершенствование технологии изготовления антирабической вакцины. // Тез.докл. - Владимир, 1995. – 149 с.
17. Пат. 2134590 Российская Федерация, МПК -6 А61К 39/205. Способ изготовления инактивированной вакцины против бешенства животных / В.В. Михалишин, Т.Н. Лезова, Н.А. Улупов, и др.; ФГУ "ВНИИЗЖ". - № 97119126/13; Заявл. 24.11.1997; Опубл. 20.08.1999, Бюл. № 23.
18. Иванов В.С. Перспектива совершенствования технологии изготовления культуральных инактивированных антирабических вакцин // Вирусные болезни с-х животных: Тез. докл. науч.-практ. конф. / ВНИИЗЖ.- Владимир, 1995.- 203 с.
19. Недосеков В.П., Вишняков И.Ф. Результаты испытаний инактивированной культуральной антирабической вакцины. // Биотехнология, теория и практика, 1988.- 1-2 (5-6).- 136 с.
20. Керимбеков К.К., Муралинов К.К., Уразбахова А.Ж. Эффективность живой и убитой антирабических вакцин при пероральной вакцинации животных // Соврем, пробл. зоонозн. инфекций: Всесоюз. Междв. конф. - Симферополь, 1981.- С. 226-227.
21. Кузнецов П.П. Ингибирующее действие антирабических антител на развитие поствакцинального иммунитета против бешенства / Кузнецов П.П., Пухов В.А., Иванов И.В., Иванов В.С. // Матер. Всероссийской конф. научно-практ. конф. Ч. I «Научные основы технологии промышленного производства вет. биол. препаратов». – Щелково, -1998. –С. 29-30.
22. Булатов Е.А., Хайруллин Б.М., Д.С. Таранов Д.С., Кондибаева Ж.Б., Табынов К.К. Безвредность инактивированной вакцины против бешенства: Производственная апробация в условиях хозяйства Алматинской области. Вестник Государственного университета им Шакарима - г Семей, 2016, -С 159-162.
23. Mondal S.K., Neelima M., Seetha Rama Reddy K., Ananda Rao K., Srinivasan V.A. Validation of the inactivant binary ethylenimine for inactivating rabies virus for veterinary rabies vaccine production // Biologicals. – 2005. – Vol. 33. – P. 185-189.

References

1. Kuznecov P.P., Tarshis M.G. Beshenstvozhivotnyh. M., 1981.S.56.
2. Batanova ZH.M., Әbdіқadyrova Ә.М., Ahmetsadykov N.N. Қазақстан Respublikasyndaғы кәтурукт уңдеттик зһардају. Nauchno-prakticheskij zhurnal «Veterinariya». - № 2 (18).- 2011. P. 35-39.
3. Abdrahmanov S.K., Esenbaev K.K., Dyusembaev S.T. Epidemiologicheskaya situaciya beshenstva v Respublike Kazahstan // Molodoj uchenyj. - 2017. - №6.1. - P. 1-4.
4. Purevhu С. Kul'tural'naya inaktivirovannaya vakcina protiv beshenstva iz shtammov «VNIiZH» i «EPA»: avtoref. dis.. .kand. vet. nauk. – Vladimir, 2005. - P.21-22.

5. Komitet ekspertov VOZ po beshenstvu: 8-j doklad. - ZHeneva: VOZ, 1994. - p.117.

6. Komitet ekspertov VOZ po standartizacii biologicheskikh preparatov: 31-j doklad. - ZHeneva: VOZ, 1983. - p.327.

7. Ivanov B.C., Skichko N.D. Razrabotka i vnedrenie v promyshlennoe proizvodstvo i veterinarnuyu praktiku Rossii kul'tural'nyh inaktivirovannykh vaksin protiv beshenstva. Tez. dokl. nauch.-proizvod. konf., 27-30 avgusta 1996 g., Kursk, 1996, P. 126-128.

8. Kondibaeva ZH.B., Hajrullin B.M. i dr. Sravnitel'noe izuchenie inaktivacii virusa bolezni Aueski dimerom etilenimina i formal'degidom // Kazahskij agrotekhnicheskij universitet im S.Sejfullina ZHurnal Vestnik nauki №4 - Astana, 2011 g. P.9-14.

9. Zhugunissof K., Bulatov Ye., Taranov D., Yershebulov Z., Koshemetov Zh., Zhunushov A., Renukaradhya G., Tabynov K., Abduraimov Ye. 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 // Veterinary Microbiology. – 2018. – 226. – P. 23-30 (Elsevier)

10. Gochmuradov M.G. Uovershenstvovanie tekhnologii promyshlennogo proizvodstva inaktivirovannoj vakciny protiv beshenstva zhivotnyh: Avtoref. dis. ... kand. vet. nauk: - Vladimir, 1999. - p. 33.

11. Vishnyakov I.F., Nikishin I.V., Nedosekov V.V. idr. Inaktivirovannaya kul'tural'naya vakcina protiv beshenstva // Veterinariya. - 1998. - №1. - P.22-25.

12. Slivko I.A., Nedosekov V.V., Hripunov E.M. i dr. Izuchenie uslovij kul'tivirovaniya i inaktivacii virusa beshenstva // Mater. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. - Pokrov, 2001. - P. 68-70.

13. Vishnyakov I.F., Nikishin I.V., Nedosekov V.V., Gorshkova T.F., ZHesterev V.I., Shevchenko A.A., Zuev V.V., Gruzdev K.N. Inaktivirovannaya kul'tural'naya vakcina protiv beshenstva zhivotnyh // Veterinariya. - 1998.- № 6. - P.76-80.

14. Reed L., Muench H. A simple's method of estimation fifty percent and pints. // J. Amer. Hyg. 1938. -V.27.- P.493-497.

15. St 405-1919-04 gp-099-2017 Test-sistema dlya diagnostiki beshenstva metodom immunofermentnogo analiza.

16. SHipilov V.I., Dudnikov S.A. Uovershenstvovanie tekhnologii izgotovleniya antirabicheskoy vakciny. // Tez. dokl. Vladimir, 1995. -. p.149/

15. Pat. 2134590 Rossijskaya Federaciya, MPK -6 A61K 39/205. Sposob izgotovleniya inaktivirovannoj vakciny protiv beshenstva zhivotnyh / V.V. Mihalishin, T.N. Lezova, N.A. Ulupov, i dr.; FGU "VNIIZZH".- № 97119126/13; Zayavl. 24.11.1997; Opubl.20.08.1999, Byul. № 23.

16. Ivanov B.C. Perspektiva sovershenstvovaniya tekhnologii izgotovleniya kul'tural'nyh inaktivirovannykh antirabicheskikh vaksin // Virusnye bolezni s-h zhivotnyh: Tez. dokl. nauch.-prakt. konf. / VNIIZZH.- Vladimir, 1995.- p.203.

17. Pat. 2134590 Rossijskaya Federaciya, MPK -6 A61K 39/205. Sposob izgotovleniya inaktivirovannoj vakciny protiv beshenstva zhivotnyh / V.V.

Mihalishin, T.N. Lezova, N.A. Ulupov, i dr.; FGU "VNIIZZH".- № 97119126/13; Zayavl. 24.11.1997; Opubl.20.08.1999, Byul. № 23.

18. Ivanov B.C. Perspektiva sovershenstvovaniya tekhnologii izgotovleniya kul'tural'nyh inaktivirovannyh antirabicheskikh vaksin // Virusnye bolezni s-h zivotnyh: Tez. dokl. nauch.-prakt. konf. / VNIIZZH.- Vladimir,1995.- p.203.

19. Nedosekov V.P., Vishnyakov I.F. Rezul'taty ispytaniy inaktivirovannoj kul'tural'noj antirabicheskoy vakciny. // Biotekhnologiya, teoriya i praktika, 1988.- 1-2 (5-6).- p.136.

20. Kerimbekov K.K., Muralinov K.K., Urazbahova A.ZH. Effektivnost' zhivoj i ubitoj antirabicheskikh vaksin pri peroral'noj vakcinacii zivotnyh // Sovrem, probl. zoonozn. infekcij: Vsesoyuz. Mezhdv.konf. -Simferopol', 1981.- P. 226 227

21. Kuznecov P.P. Ingibiruyushchee dejstvie antirabicheskikh antitel na razvitie postvakcinal'nogo immuniteta protiv beshenstva / Kuznecov P.P., Puhov V.A., Ivanov I.V., Ivanov V.S. // Mater. Vserossijskoj konf. nauchno-prakt. konf. CH. I «Nauchnye osnovy tekhnologii promyshlennogo proizvodstva vet.biol. preparatov». - SHCHelkovo. -1998. – p.29-30.

22. Bulatov E.A., Hajrullin B.M., D.S. Taranov D.S., Kondibaeva ZH.B., Tabynov K.K. Bezvrednost' inaktivirovannoj vakciny protiv beshenstva: Proizvodstvennaya aprobaciya v usloviyah hozyajstva Almatinskoj oblasti. Vestnik Gosudarstvennogo universiteta im SHakarima g Semej, 2016. P. 159-162.

23. Mondal S.K., Neelima M., Seetha Rama Reddy K., Ananda Rao K., Srinivasan V.A. Validation of the inactivant binary ethylenimine for inactivating rabies virus for veterinary rabies vaccine production // Biologicals. – 2005. – Vol. 33. – P. 185-189.

DETERMINATION OF OPTIMAL CONCENTRATION DIMERETHYLENIMINE FOR INACTIVATION OF STAMM OF "VRC-Z2" OF RABIES VIRUS

*ZH.B.Kondibaeva, K.D.Zhugunissov,
N.K. Dalbayev, Z.Yershebulov, Ye.A.Bulatov
RSE "Research Institute of Biosafety Problems" KN MES RK, settlement
Guards, Republic of Kazakhstan*

Summary

The results of studying of dimerethyleneimine at final concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3 % as for rabies virus of the strain "VRC-RZ2" are given in this paper. As a result of the studies carried out, dimerethyleneimine is found to be an effective inactivant when inactivating rabies virus strain "VRC-RZ2." Therefore, for widespread use in the production of inactivated rabies vaccines, we have selected and recommended the inactivant dimerethyleneimine at a final concentration of 0.2% at a temperature of $(37 \pm 0.5) ^\circ \text{C}$, which for 24 hours completely destroys the infectious

properties of rabies virus while maintaining high antigenic activity. The developed inactivation regime in the production of industrial series of rabies vaccines, provides complete inactivation of rabies virus, and we get a safe drug. Determination of residual virulence was carried out on a cell culture of BHK-21/13 for 3 consecutive passages. The results of the studies showed that when the VNK-21/13 cell culture was infected with an inactivated virus suspension within 10 days of observation, there was no manifestation of destructive changes in the monolayer with three consecutive passaging. When studying the avirulence of inactivated materials on 3-5 day old sucker mice, they remained alive, without showing any clinical signs of the disease throughout the observation period (10 days). The results obtained indicated that the studied samples were avirulent.

Based on the above, it follows that DEI is effective in the inactivation of rabies virus and is recommended for widespread use in the production of inactivated rabies vaccines

Key words: virus, strain, rabies, inactivant, dimerethylenimine, cell culture, ELISA, antigenic activity.

ҚҰТЫРЫҚ ВИРУСЫНЫҢ «VRC-RZ2» ШТАМЫН ИНАКТИВАЦИЯЛАУ ҮШІН ДИМЕРЭТИЛЕНИМИННІҢ БЕЛСЕНДІ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫН АНЫҚТАУ

*Ж.Б.Қондыбаева, К.Д. Жүгүнісов, Н.К. Далбаев
З.Д. Ершебұлов, Е.А. Болатов*

*РМК Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты
БҒМ ҒК ҚР*

Түйін

Мақалада құтырық вирусының «VRC-RZ2» штамын инфекциялық белсенділігін жою мақсатта инактивант ретінде димерэтилениминнің 0,1, 0,2 және 0,3% концентрациялары қолданыла отырып зерттеу жүргізілді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде, құтыру вирусының «VRC-RZ2» штамын инактивациялау кезінде димерэтилениминнің тиімді инактивант екені анықталды. Осыны негізге ала отырып, өндірісте құтырыққа қарсы инактивтелінген вакцинаны пайдалану ұсынылды және ДЭИ инактивантының 0,2% концентрациясымен ($37 \pm 0,5$) °C температурада 24 сағат ішінде антигендік қасиетін сақтай отырып, инфекциялық қасиетін толығымен жоятыны анықталды. Өзірленген инактивация режимі құтырыққа қарсы вакцинаның өнеркәсіптік серияларын өндіру кезінде қамтамасыз етеді және қауіпсіз препарат алынады.

Кілттік сөздер: вирус, штам, құтыру, инактивант, димерэтиленимин, торша өсіндісі, ИФТ, антигендік белсенділігі.

Благодарность

Авторы выражают глубокую благодарность всему коллективу лабораторий «Технологии культивирования микроорганизмов» НИИПББ КН МОН РК, в частности старшему научному сотруднику Таранову Д.С., научному сотруднику Амановой Ж.Т., младшему научному сотруднику Саметовой Ж.Ж., старшему лаборанту Шаяхметову Е.А., лаборантам Батырхановой К.С и Алимбаева Е.Ж. за проведения исследований.

Работа выполняется в рамках ПЦФ МСХ РК «Ветеринарная безопасность территории Республики Казахстан: эпизоотологический мониторинг, испытание, внедрение и коммерциализация средств специфической профилактики и диагностики особо опасных инфекционных заболеваний» (ИРН:BR06249226-ОТ-18-СВ) на 2018–2020гг. по проекту: «Коммерциализация вакцины инактивированной против бешенства животных».