

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы

Раимбаева Шынар Арманқызы

«Ауыл шаруашылық жануарларының репродуктивті және тыныс алу синдромына қарсы вакциналарды өндіру технологиясын жасау»

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 – «Биотехнология»

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы



ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Ауыл шаруашылық жануарларының репродуктивті және тыныс алу синдромына қарсы вакциналарды өндіру технологиясын жасау»

5B070100 – «Биотехнология»

Орындаған

Раимбаева Ш.А

Пікір беруші

химия.ғыл.кан-ы, ассоц.профессор

З.Сакиева Сакиева З.Ж

«2» 05 2019 ж.

Ғылыми жетекші

биол.ғыл.док-ры, ассоц.профессор

Г.Курбанова Курбанова Г.В.

«6» маусым 2019 ж.

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы

5B070100 – «Биотехнология»



БЕКІТЕМІН

БТ кафедра меңгерушісі

PhD профессор

З.К.Туйебахова

«16» Маусыр 2019ж.

**Дипломдық жұмыс орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Раимбаева Шынар Арманқызы

Тақырыбы : Ауыл шаруашылық жануарларының репродуктивті және тыныс алу синдромына қарсы вакциналарды өндіру технологиясын жасау

Университет Ректорының 2018жылғы «16» қазан №1163- бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 2019 жылғы «19» сәуір

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері: Диплом алды өнеркәсіптік практикада алынған материалдар

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

а) штаммдардың вирустық суспензияларын залалсыздандыру;

б) вакцинада бөгде микрофлораның жоқтығын бағалау;

в) залалсыздандырылған биомассаны тангенциальды толқынында ультра сүзу әдісімен қоюландыру;

Ұсынылатын негізгі әдебиет: атау 26

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке шолу	Қаңтар	
Материалдар мен әдістер	Ақпан	
Зерттеу нәтижелері	Наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен
норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Ғылыми жетекші, кеңесшілер, аты-жөні, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қолтаңба қойылған мерзімі	Қолы
Әдеби шолу	б.ғ.д.ассоц.профессор Курбанова Г.В.	6.05.2019	
Материалдар мен әдістер			
Зерттеу нәтижелері			
Норма бақылау	Ғылым магистрі Сагимбаева А.М.	6.05.2019	

Ғылыми жетекші  Курбанова Г.В.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы  Раимбаева Ш.А.

Күні «06» 05 2019 ж.

АҢДАТПА

Дипломдық жұмыстың мақсаты: шошқаның репродуктивті-респираторлы синдромы ауруына қарсы отандық бивалентті залалсыздандырылған вакцинаны дайындаудың технологиясын жасап шығару.

Зерттеу нысаны мен әдістері: жұмысты орындау барысында отандық бивалентті инактивацияланған вакцина дайындау технологиясын әзірлеу үшін шошқаның репродуктивті-респираторлық синдромы вирусының еуропалық және солтүстікамерикандық генотиптеріне қарсы иммуногендік вакцина дайындау технологиясын іздеу бойынша зерттеулер жүргізілді.

Жұмыстың тәжірибелік бөлігі ҚазҰАУ Ветеринария факультетінің вивария жағдайында орындалды. Зертханалық физиологиялық-биохимиялық зерттеулер ҚазҰАУ ветеринариялық факультетінің клиникасының аккредиттелген ветеринариялық зертханасында жүргізілді.

Зерттеу нысаны – ШРРС вирусының солтүстік американдық және еуропалық генотиптері.

Алынған нәтижелер: ШРРС қарсы инактивирленген вакцина дайындау технологиясы жасалды.

Дипломдық жұмыс 35 беттен 1 кестеден, 3 суреттен, 16 әдебиеттен тұрады.

АННОТАЦИЯ

Цель дипломной работы: разработка технологии изготовления отечественной инактивированной бивалентной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней европейского и североамериканского генотипов.

Объекты и методы исследования: при выполнении работ проведены исследования по поиску технологии изготовления иммуногенной вакцины против европейских и североамериканских генотипов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней для разработки технологии изготовления отечественной бивалентной инактивированной вакцины.

Практическая часть работы выполнена в условиях виварии факультета ветеринарии КазНАУ. Лабораторные физиолого-биохимические исследования проводились в аккредитованной ветеринарной лаборатории клиники ветеринарного факультета КазНАУ.

Объект исследования-североамериканские и европейские генотипы вируса РРСС.

Полученные результаты: разработана технология приготовления инактивированной вакцины против ШРРС.

Дипломная работа изложена на 35 страницах, содержит 1 таблицу, 3 рисунков, 16 литературных источников.

ANNOTATION

The purpose of the thesis: development of technology for the manufacture of domestic inactivated bivalent vaccine against reproductive and respiratory syndrome of European and North American swine genotypes.

Objects and methods of research: in the course of the work, research was carried out to find the technology of manufacturing an immunogenic vaccine against European and North American genotypes of the virus of reproductive and respiratory syndrome of pigs for the development of technology for the manufacture of domestic bivalent inactivated vaccine.

The practical part of the work was done in the conditions of the vivarium of the faculty of veterinary of KazNAU. Laboratory physiological and biochemical studies were carried out in the accredited veterinary laboratory of the clinic of the veterinary faculty of KazNAU. The object of the study is the North American and European genotypes of the RRSP virus.

Obtained results: the technology of preparation of inactivated vaccine against RRSP.

The thesis is presented on 35 pages, contains 1 table, 3 figures, 16 literature sources.

МАЗМҰНЫ

	КІРІСПЕ	9
1	ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ	10
1.1	Зерттеу бағытын таңдау	10
2	Материалдар мен әдістер	19
2.1	Материалдар	19
2.2	Әдістері	19
2.2.1	MARC-145 жасушалық культурасында ШРРС вирусының өсіру	20
2.2.2	Вирустың жұқпалы титрін анықтау	20
2.2.3	Инактиванттың жұмыс ерітіндісін дайындау	20
2.2.4	ШРРС вирусының инактивациясы	20
2.2.5	ШРРС вирусы штамдарының концентрацияланған суспензиясын алу	20
2.2.6	ШРРС вирусының инактивациясының толықтығын анықтау әдістемесі	21
2.2.7	Вакцинаның вирустық шикізаты мен эксперименттік үлгілерінің стерильділігін бақылау	21
2.2.8	ШРРС қарсы вакцинаның эксперименталды үлгісін жасау	
2.2.9	Вакцинаның зиянсыздығын анықтау	21
2.2.10	Жануарларды жұқтыру, қан сынамаларын іріктеу	22
2.2.11	Серологиялық зерттеулер	22
2.2.12	Егілген шошқаларда вакцинаның иммундау дозасын және иммунитет басталу мерзімін анықтау	22
2.2.13	Сақтау кезінде вакцинаның сақталуы	22
2.2.14	Эксперименталды деректерді статистикалық өңдеу	23
3	Зерттеу нәтижелері	24
3.1	ШРРС вирусының өзекті штамдарын таңдау	24
3.1.1	ШРРС вирусының штамдарының культуральды суспензиясын алу	
	Тиімді инактивантты таңдау және ШРРС вирусын	25
3.2	инактивациялаудың оңтайлы параметрлерін өңдеу	
	ШРРС вирусының инактивирленген, ағартылған,	27
3.2.1	концентрацияланған суспензиясын алу	
	Зерттеу нәтижелерін қорытындылау және бағалау	28
4	ҚОРЫТЫНДЫ	30
	АНЫҚТАМАЛАР, БЕЛГІЛЕУЛЕР ЖӘНЕ ҚЫСҚАРТУЛАР	33
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	34
		35

КІРІСПЕ

Шошқаның репродуктивті-респираторлық синдромы - шошқаның репродуктивті функциясының патологиясымен сипатталатын шошқаның жоғары контагиозды вирустық ауруы. ШРРС вирусы кең таралған және шошқа шаруашылығы дамыған барлық елдерде тіркелді.

ШРРС бақылаудың көптеген түрлі схемалары бар, алайда қазіргі уақытқа дейін ең тиімді және экономикалық тиімді таңдау мәселесі ашық күйінде қалып отыр.

Жұмыстың мақсаты – шошқаның репродуктивті-респираторлы синдромы ауруына қарсы отандық бивалентті залалсыздандырылған вакцинаны дайындаудың технологиясын жасап шығару болып табылады.

Зерттеу нысаны ретінде Қазақстандық шошқаның репродуктивті-респираторлы синдромы (ШРРС) вирусының солтүстік американдық және еуропалық генотиптерінің штаммдары болып табылады.

Жұмыстың міндеті:

- 1 ШРРС вирусының солтүстік американдық және еуропалық генотиптеріне қарсы вакцинаның Қазақстандық штаммдарынан індеттік белсенділігі бар вирустық суспензияларды алу;
- 2 Штаммдардың залалсыздандырылған вирустық суспензияларының авируленттігін анықтау;
- 3 ШРРС вирусы штаммдарының концентрацияланған суспензиясын алу.

1 Әдебиетке шолу

1.1 Зерттеу бағытын таңдау

Шошқаның репродуктивті-респираторлық синдромы (ШРРС) - супорос мерзімінің соңында түсік тастаумен, өмірінің алғашқы 2-3 аптасын өлген және әлсіз торайлардың тууымен және торайларда тыныс алу органдарының зақымдануымен сипатталатын контагиозды вирустық ауру. Ауру алғаш рет 1987 жылы АҚШ-та және Канадада тіркелген, алайда арнайы антиденелер 1979 жылы Канада шаруашылықтарында шошқадан табылды. 1990 жылдың аяғында ұқсас белгілері бар ауру Германияда, ал 1991-1992 жылдары – Еуропаның көптеген елдерінде анықталды. Ресейде ауру алғаш рет 1991 жылы Курск облысының шаруашылықтарында байқалған [1]. Сондай-ақ, ШРСС дамыған шошқа шаруашылығы бар әлемнің көптеген елдерінде кеңінен таралған және жиі жасырын түрде өтеді.

Қазақстан Республикасында Бүкілресейлік жануарларды қорғау ғылыми-зерттеу институты қызметкерлері 2008 жылы Қостанай облысында және 2010 жылы Жамбыл облысында ШРРС вирусының изоляторларын бөлді.

Аурудың қоздырғышы болып алғаш рет голланд зерттеушілері 1991 жылдың ортасында оқшаулаған құрамында РНК-сы бар вирус болып табылады. Еуропа, Солтүстік Америка және Азияның әртүрлі елдерінде бөлінген ШРСС вирусының штамдары геномдық РНК нуклеотидтерінің вируленттілігімен, антигендік құрылымымен және реттілігімен ерекшеленеді.

ШРРС – еуропалық және солтүстік американдық вирусының кем дегенде екі генотипі бар; олардың арасындағы нуклеотидті деңгейде гомология тек 55-70% - ды, ал генотиптердің ішінде 87-97% - ды құрайды. Вирустың еуропалық генотипі Еуропа елдерінде, ал Солтүстік Америка және Азия елдерінде айналымда. Алайда, жақында еуропалық вирус генотипі АҚШ пен Канадада, ал американдық – Словакияда шошқалардан оқшауланды. Шаруашылықта ШРСС пайда болған жағдайда, тірі торайлар бір шошқаға 50-60% төмендейді, ал басқа қоздырғыштармен ассоциацияланған кезде ауру айтарлықтай ауыр өтеді.

ШРРС бойынша 6 айда өлі туу, туылу, өлу нәтижесінде таза емес шаруашылықтарда торайлар 68% толық алынбаған, ал ШРРС өткір өршу кезінде жылдық өнімділік 20-30% - ға төмендегені туралы деректер бар [4].

Қазақстан Республикасы Статистика агенттігінің мәліметінше, 2015 жылдың 1 мамырына республикада 958,2 мың бас шошқа болды. Қазақстан Республикасының аумағында ШРРС өршуі туындаған жағдайда, шошқа басы айтарлықтай төмендейді, бұл үлкен экономикалық шығындарға әкеледі.

Бірқатар елдерде ШРРС-ның ерекше алдын алу үшін тірі және инактивирленген вакциналар әзірленген [6]. Өндірісте технологиялылығы мен қарапайымдылығына байланысты тірі вакциналардың артықшылығы күмән тудырмайды, алайда шошқаның иммундық реакциясы оларды енгізгенде әрдайым тұрақты емес және бірқатар жағдайларда вакцинациядан кейін асқынулар туғызады. Мәселен, 1996 жылдан бастап тірі вакциналар кеңінен

қолданылған АҚШ-тың бірқатар ірі шошқа шаруашылықтарында супоростық мерзімінің ортасында және аяғында шошқаның жаппай түсік тастауымен (10-50 %) ілесе жүретін жіті немесе атипті ШРРС-ның өршуі байқалды. Вирустың барлық бөлінген штамдары вакцина штаммымен генетикалық шығу тегі бойынша жақын болған және оның мутанттары (патогенді ревертанттары) болған. ШРРС бойынша күрделі эпизоотиялық жағдай 1996 жылы тірі вакцинаны қолдануға байланысты Данияда қалыптасты. Елдегі аурудың алғашқы жағдайы 1992 жылдың наурызында диагноз қойылған. 1996 жылдың ортасында барлық шошқа шаруашылықтары шошқаның қан сарысуында ШРРС вирусына антиденелердің болуына тексерілді. Шаруашылықтың шамамен 30% - да серопозитивті жануарлар табылды. Алайда, ауру, әдетте, жеңіл немесе субклиникалық түрде өтті. 8-айлық мерзім ішінде вирустың американдық түрі тексерілген 550 малдан 114 шаруашылықтан өлі және әлсіз торайлар тіндерінен бөлінген. Тірі вакцинаны қолданғанға дейін ШРРС вирусының американдық генотипі Данияның және Еуропаның басқа да елдерінің шошқа шаруашылықтарында айналмаған. 1996 жылдың соңында Данияда торайларды вакцинациялау тоқтатылды. Кейбір тірі вакциналарды жан-жақты бағалау кезінде олар қауіпсіз емес екені анықталды [5].

Патогендіктің реверсиясы тек нүктелі мутациялармен ғана емес, вирустың вакциналық және далалық штамдары арасындағы рекомбинациямен де байланысты болуы мүмкін. Жасушалар мәдениетінде ШРРС вирусының әртүрлі штамдарының арасындағы рекомбинация өте жоғары. Алайда, ағзада рекомбинация вирустың генетикалық жақын туыстық штамдарының арасында және салыстырмалы түрде сирек кездеседі. Вирустың американдық және еуропалық штамдары арасында рекомбинанттардың пайда болу ықтималдығы аз.

Солтүстік Америка құрлығында (АҚШ және Канада), сондай-ақ Оңтүстік-Шығыс Азия (Оңтүстік Корея) және Еуропа (Дания, Германия) бірқатар елдерінде «IngelvacRespPRRSMLV» (АҚШ) ШРРС қарсы тірі вакцина кеңінен қолданылады [2]. Бұл модификацияланған тірі вакцина алғаш рет нарықта 1994 жылы «RespPRRS» (АҚШ-та) және «IngelvacPRRSMLV» (Еуропада) атауымен пайда болды. Алдымен бұл вакцина торайларда ШРРС трансплацентарлық түрін болдырмау үшін ұсынылды. 1996 жылдан бастап (RespPRRS/Repo) ол бос шошқаларды иммунизациялау үшін ұсынылды. Жануарларды қорғау вакцинациядан кейін 7 күннен соң басталды, препарат ШРРС вирусының американдық және еуропалық штамдарын жұқтырудан сақталды. Алайда, пайдаланылған вакцина вирусы иммунизацияланған қабандардың ұрығы арқылы бөлінуі мүмкін.

Кейбір елдерде (Ресей, Испания, Франция, АҚШ) ШРРС қарсы тірі вакциналармен қатар белсенді вакциналар жасалды. АҚШ-та «PRRomiSe» коммерциялық белсенді вакцина шығарылады, сондай-ақ Испанияда жоғары тиімділікке ие «CY-218-JPD-P5-95» штаммынан дайындалған вакцина өндіріледі. Оларды егілген және кейіннен залалданған шошқалар қолданғанда

орташа алғанда тірі сау торайлардың 70% – ы, ал вакцинацияланбаған торайлардан-тек 10% - ы пайда болды.

Ресейде ШРРС ерекше алдын алу үшін инактивирленген вакциналар да әзірленді және кеңінен қолданылады. Мысалы, Курск облысы Петровский ауданының шаруашылықтарында «Курский-93» штаммынан Бүкілресейлік жануарларды қорғау ғылыми-зерттеу институты вакцинасы сәтті қолданылды. Бұл шаруашылықтарда вакцина қолданғанға дейін 38,2-62,5% шошқада қалпына келтіру патологиясы тіркелген. Иммундау жүргізілгеннен кейін 5-6 айдан кейін шаруашылықтардың эпизоотологиялық тексеруінің нәтижелері инактивирленген вакцина арнайы антиденелердің пайда болуын индуцирлегенін, және шошқаларды ШРРС-тан қорғауды қамтамасыз еткенін көрсетті. Бұл бақылау шаруашылығында 42,4% салыстырғанда ұдайы өндіру патологиясының 16-10% - ға дейін төмендеуіне әкелді. Сондай-ақ, 20-30 күндік торайларды иммундау оларды респираторлық синдромның көрінуінен және өлімнен сақтауға мүмкіндік бергендігі анықталды.

Ресейде ШРРС-на қарсы инактивирленген вакциналар өндірісі де «НАРВАК» (Мәскеу қ.) ҒӨБ-да жүзеге асырылады. Бұл бірлестік монопрепарат түрінде ШРРС қарсы белсенді вакцина және парвовирустық ауруларға, лептоспирозға, Ауески және ШРРС (ПЛАР) ауруларына қарсы құрама вакцина әзірледі. Вакцинаны дайындау үшін репродукция патологиясы бар шошқаның қан сарысуынан бөлінген «ОБ» вирусты штамм қолданылды. Бұл вакциналарды 3 айлық торайларда ШРРС вирусына антиденелері жоқ және қояндарда зертханалық сынау олардың зиянсыздығын және антиген белсенділігін көрсетті [7].

Қазір шошқа өсіру өнеркәсібі дамыған әлемнің көптеген елдерінде жануарларды иммундау үшін ШРРС-на қарсы инактивирленген вакцина қолданылады. Осының бәрі қауіпсіз және тиімділігі жоғары инактивирленген препараттарды жасау өте нақты екенін көрсетеді. Сонымен қатар, инактивирленген вакциналарды қолдану бірқатар артықшылықтар береді. Біріншіден, бұл вакциналарды әлемнің әлсіз дамыған шошқа өсіретін өңірлерінде қолданғанда олар аттенуирленген типті вакциналарға қарағанда тиімдірек болып шықты. Екіншіден, вирустың реверсия қаупі және аурудың пайда болу мүмкіндігі тек инактивирленген вирусты антигендерді қолданғанда ғана болдырмауға болады. Сондай-ақ олар жиі суық сақтауды талап етпейді, бұл ыңғайлы пайдалану.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институтында (БҒЗЖҚИ) 1833-ҒФ «шошқалардың репродуктивті-респираторлық синдромына қарсы инактивирленген вакцина дайындау технологиясын әзірлеу» гранттық жобасы шеңберінде 2012-2014 жылдарға арналған ШРРС солтүстікамерикандық генотипіне қарсы моновалентті инактивирленген вакцина әзірленді. Қауіпсіздік, иммуногенділік және иммунобиологиялық сипаттамалары бойынша дайындалған Вакцина DOBIO® (Қытай) компаниясы өндіретін NVDC-JXA1 шетелдік аналогынан кем түспеді [10].

ШРРС проблемасын жан-жақты зерттеу 1993-1994 жылдары бірнеше шетелдік компанияларға ШРРС-на қарсы тиімді коммерциялық тірі және белсенді вакциналар әзірлеуге мүмкіндік берді. «CYBLUE®» ШРРС қарсы алғашқы коммерциялық инактивацияланған вакцина 1993 жылы испан «CYANAMID IBERICA» компаниясымен құрылды. Солтүстік Америка құрлығында, атап айтқанда АҚШ пен Канадада ШРРС-на қарсы тірі вакцинадан басқа, сондай-ақ белсендірілген вакциналарды да пайдаланады. Тәжірибелерде кейінгілердің тиімділігі белгіленген. Канадада IAF-KLOP вирулентті канадалық изоляторымен жұқтырылған вакцинамен егілген, және кейіннен жұқтырған торайлардан 14 күннен кейін вирус өкпеден тек 53,8% - ға және көкбауырдан 7,7% - ға бөлініп шықты, ал вакцинацияланбаған бақылау жануарларында бұл көрсеткіштер тиісінше 100% және 71,5% - ды құрады. Егілген және бақылау жұқтырған торайларда сондай-ақ ШРРС клиникалық белгілері болмаған, бұған қарама-қарсы бақылаудағы малдарда аурудың тән клиникалық көрінісі байқалды. Барлық бақылаудағы жануарларда ашылған кезде өкпеде патологиялық өзгерістер, ал вакцинацияланғанда тек 13 – тен 1-де (7,7%) ғана анықталды [2].

АҚШ-та Intervet компаниясы коммерциялық өлтірілген PRRomise вакцинасын шығарады [3], ол АҚШ-тың Ауыл шаруашылығы департаментімен лицензияланған (United States Department of Agriculture, USDA) алғашқы және әзірге жалғыз инактивацияланған вакцина болып табылады [4]. Ірі шошқа шаруашылықтарында осы препаратты сынау шошқалар топтарында екі рет иммундаудан кейін 1 тірекке (бақылау тобындағы 11,12% қарсы 11,16%) торайлардың жалпы саны өскенін, тірі торайлардың шығуы (бақылаудағы 9,84% қарсы 10,09%), өлі туғандардың (бақылаудағы 0,96% қарсы 0,84%) және мумифицирленген жемістердің (бақылаудағы 0,32% қарсы 0,23%) саны төмендегенін көрсетті. Тәжірибелік және бақылау тобында алғашқы иммундау алдында серопозитивті жануарлардың саны 72,9% және 79,1% деңгейінде, екінші вакцинация алдында – 96% және 77 %, балдыр алдында – 86% және 57% деңгейінде болды.

Plana-Duran [5] испандық CY-218-JPD-P5-91 штаммынан (Olot) дайындалған ШРРС қарсы инактивацияланған вакцинаның жоғары тиімділігі туралы хабарлады. Вакцина егілген және кейіннен жұқтырғандардан тірі сау торайлардың орташа 70% – ы, ал вакцина егілмеген торайлардан тек 10% - ы ғана пайда болды.

Францияда *MERIAL* компаниясында инактивацияланған PROGRESSIS® вакцина әзірленіп, шығарылады [24]. *In vivo* зерттеулерінде P-120 еуропалық штаммынан PROGRESSIS® вакцинасымен иммундалған инактивацияланған торайларда әртүрлі еуропалық вирулентті оқшаулағыштармен жұқтырғаннан кейін егілмеген деңгейлерде гамма интерфероны (IFN-γ) пайда болды. Екі американдық штаммды бір-біріне жұқтырғаннан кейін (Ceb US) IFN-γ деңгейі шамалы болды, ал басқа штамм (NADC 20 US) еуропалық штаммдарға ұқсас болды [6]. PROGRESSIS® вакцинасын Данияның репродуктивті шаруашылықтарында сынау оның тиімділігін көрсетті [7].

PROGRESSIS® вакцинасының антигендік белсенділігін алпыс 6-8 апталық торайларда зерттеу көрсеткендей, 1-ші, 2-ші және 3-ші иммундаудан кейін тек жеке жануарлар РН-да 1:4-1:8 титрінде антиденелер болған. 4-ші және 5-ші РН-да серопозитивті вакцинациядан кейін торайлар тиісінше 30,95% және 40% болды. Антиденелердің ең жоғарғы титрі 1:16 (10 торайда, яғни жануарлардың 16,7%) және 1:32 (2 торайларда, яғни 3,3%) болған. Жүргізілген зерттеу нәтижесінде авторлар инактивирленген вакциналар ШРРС вирусына вирусты жұқтыратын антиденелердің әлсіз индукторы болып табылады деген қорытынды жасады. Алайда, IFN-γ жоғары өндіріспен ассоциациядағы вирусты жұқтырғыш антиденелердің төмен деңгейі ШРРС қарсы иммундау бағдарламаларында инактивирленген препараттарды табысты пайдалануға мүмкіндік береді [8].

Болгарияда инактивирленген SUIPRAVAC-PRRS (HIPRA, Испания) вакцинасын қолдану ШРРС қарсы егілген шошқалардан алынған өсірілген торайлардың сақталуы иммунизацияланбаған шошқа торайларына қарағанда (өлім-жітім 2,20%) жоғары болғанын көрсетті (өлім-жітім 3,39% және 5,03 %) [10]. Инактивацияланған вакцинамен қабандарды иммундау ШРРС далалық вирусының спермамен бөлінуін болдырмағаны эксперименталды анықталды. [11].

Ресейде ШРРС арнайы алдын алу үшін инактивирленген вакциналар әзірленді және кеңінен қолданылады [12]. Мысалы, «Курский-93» штаммынан жасалған эксперименталды инактивирленген вакцинаны қолдану кезінде 5-6 айдан кейін бақылау шаруашылығында 42,4% - бен салыстырғанда ұдайы өндіру патологиясының 10-16% - ға дейін төмендегені байқалды. Сондай-ақ, 20-30-күндік торайларды иммундау оларды респираторлық синдром көріністерінен және өлімінен сақтауға мүмкіндік бергендігі анықталды [15].

Қазіргі уақытта ШРРС ерекше профилактика үшін Ресейде ШРРС және «БЖҚҒЗИ» ФГУ өндірісінің шошқаның парвовирустық инфекциясына (ПВИС) қарсы эмульсиялық инактивирленген вакцинасы кеңінен қолданылады. Вакцинаны қолдану жағдайды 6-12 ай ішінде тұрақтандыруға мүмкіндік берді, өлі торайлар әкелетін шошқалар саны 1% - ға дейін азайған [14].

Инактивацияланған вакциналар тиімділігінің маңызды шарты вирусты антиген мөлшері мен сапасы, антигендікті барынша сақтай отырып, инфекциялық вирусынан толық айыруға мүмкіндік беретін инактивантты және оңтайлы жағдайларды таңдау болып табылады [18].

Инактивирленген вирустық вакциналар әдетте иммуногендігін сақтай отырып, химиялық және физикалық әдістермен вирусты бұзатын вирустардан дайындалады. Мұндай вакциналар қауіпсіз және құрамында иммундық жауапты және антиденелердің пайда болуын туғызу үшін вирусты антиген көп болуы тиіс.

Инактивацияланған вакциналарды өндіру технологиясында химиялық немесе физикалық инактивация әдісін таңдау маңызды болып табылады. Қолданылатын әдістер өзінің артықшылықтары мен кемшіліктерін анықтайды

және қандай да бір тәсілді таңдауда барлық тараптар мен факторлар ескерілуі тиіс.

Химиялық қосылыстардан ең жиі инактиванттардың екі түрі қолданылады: ретикуляциялық (қопсытушы) агенттер және алкилдеуші агенттер. Ретикуляциялық агенттерге альдегидтер, соның ішінде формальдегид, глютаральдегид және глицидальдегид жатады, олардың ішінде формальдегид жиі қолданылады [17]. Формальдегид реакциясы аминотоптармен кері қайтатынын атап өткен жөн, яғни реагенттің артығын алып тастағанда немесе ерітіндіні сұйылғанда нуклеин қышқылының белсенділігі қалпына келтірілуі мүмкін. Вирустың формальдегидпен өзара әрекеттесу процесі реагенттің концентрациясы, инактивация уақыты, рН және реакциялық ортаның температурасы сияқты факторларға байланысты. Инактивацияның оңтайлы жағдайында формальдегидтің көптеген вирустардың ақуыздарымен өзара әрекеттесуі олардың антигендік қасиеттеріне айтарлықтай әсер етпейді [14].

Отандық және шетелдік әдебиеттерді талдау вирустардың инфекциялық белсенділігін басу үшін формалин жақсы инактивант болып табылатындығын көрсетеді [13].

Соңғы жылдары зерттеушілердің назарын азиридиндер, әсіресе этиленимин және оның туындылары тартады [20]. Этиленимин-қанық, гетероциклді қосылыс, алғаш рет 1988 жылы бромэтиламин синтезделген. Этиленимин және оның туындылары олардың антигендік қасиеттерін сақтай отырып, вирустарға белсенді әсер етеді. Этилениминнің вирустарға инактивациялаушы әсері нуклеин қышқылдарының деполимерленуімен және кейіннен деполимерленуімен түсіндіріледі.

Вирустарды инактивациялау үшін ацетилэтиленимин (АЭИ) және әсіресе этилениминмен салыстырғанда уыттылығы аз димерэтиленимина (ДЭИ) жиі қолданылады. ДЭИ өндірісі Покровка биопрепараттар зауытында (Ресей) жолға қойылған өнеркәсіптік этилениминнің туындысы болып табылады. Сусыз ДЭИ сақтау кезінде жоғары тұрақтылыққа ие. Инактивирленген вирусқа қарсы вакциналарды дайындау үшін азиридиндерді пайдалану көп жағдайда аусыл вирусын зерттеуге міндетті.

Инактивациялаушы факторлардың нуклеинді қышқылдармен және вирустардың ақуыздарымен өзара әрекеттесу механизмін зерттеу, сондай-ақ осы макромолекулалардың құрылымдық және функционалдық модификацияларын анықтау вирустардың топтық және жеке ерекшеліктерін ескере отырып, инактивациялаудың оңтайлы шарттарын таңдауға көмектеседі.

Вакцинацияның міндеті ағзаның қорғаныш механизмдерін иммуногенезге барынша тарту арқылы кернеулі және ұзақ иммунитет құру болып табылады, бұл көбінесе иммуногенезді – адъюванттарды таңдау және қолдануға байланысты. Көптеген вирусты вакциналар әлсіз иммундық реакцияларды тудырғандықтан, адъюванттарды пайдалана бастады, оларды қосу әртүрлі дәрежеде осы кемшілікті өтеуге мүмкіндік берді.

Ғалымдардың пікірінше, адъюванттар әртүрлі табиғаттағы заттар бола алады, әртүрлі жергілікті әсер етеді: «депо» жасайтын, қабыну реакциясын

тудыратын және т.б. [11]. Адьюванттар антителогенездің бастапқы кезеңдерінде болып жатқан процестерге қатысады. Адьюванттарды енгізу жасушалық пролиферацияны және жасушаларды саралауды күшейтеді, олардың метаболизмін белсендендіреді, бірақ ең алдымен адьюванттар моноцитарлы фагоцитациялайтын жүйе жасушаларының функционалдық белсенділігін өзгертеді. Соңғысы иммуногенездің қарқындылығы және оның ұзақтығы үшін аса маңызды.

Вакциналарға арналған адьюванттар жүз жылға жуық белгілі, бірақ оларды пайдалану қажеттілігі қазіргі антигендердің иммуногендік қасиеттерінің азаюынан туындады [12]. Қазіргі уақытта вакциналарды дайындау технологиясында қолданылатын негізгі адьюванттар эмульсия және алюминий тұздары болып табылады.

Алюминий тұздары әртүрлі типті болуы мүмкін [13], бірақ барлық деректерде тіпті жоғары реакциялық антигендермен өзара әрекеттескенде өте жақсы қауіпсіздік параметрлері екені туралы ақпарат бар. Антиген иондық өзара әрекеттесу арқылы адсорбцияланады, сондықтан мұндай адьюванттармен дайындалған вакциналар адсорбцияланған немесе сорбцияланған деп аталады. Алюминий тұздары антиденелердің аймақтық лимфа түйіндерінде синтезін ынталандырады және вакцинадан кейінгі грануль пайда болған жерлерде плазмалық жасушалардың жиналуын тудырады. Алюминий тұздарының әсер ету механизмі алюминийдің металл бөлшектеріндегі антиген молекулаларының адсорбциясымен байланысты. Алюминий тұздарының инъекциясынан туындаған қабыну процесі шектеулі болғандықтан, бұл адьюванттың тиімділігі де шектеулі. Сондықтан, бірнеше дәйекті инъекциялардан тұратын вакцинация ережелерін қолдануға қарамастан, алюминий негізіндегі вакциналармен ынталандырылған ұзақ иммундық жауап жоқ [14]

Эмульсиялар беттік белсенді затпен тұрақтандырылған май мен судың қоспасы болып табылады. Вакцина жасау кезінде су фазасы антиген ортасы болып табылады. Адьювантта пайдаланылатын беттік-белсенді заттың түріне және рецептурадағы адьювант пен антиген арасындағы арақатынасқа сәйкес дайындалған эмульсияның түрін бақылау мүмкіндігі бар. Вакцина үшін адьювант ретінде эмульсия үш нұсқада бар:

- антиген фазасы майдағы су эмульсиясын білдіретін адьювантта бөлінуі мүмкін (B / M);
- адьювант судағы май эмульсиясынан түзілген антигендік фазада бөлінуі мүмкін (M / B);
- су фазасы су/май/су (B/M/B) формуласы бойынша эмульсия болып табылатын адьюванта фазасының ішінде және сыртынан бөлінуі мүмкін.

MontanideGEL 01-су негізіндегі адьювант су типті вакциналардың қауіпсіздігі мен тиімділігін жақсарту үшін әзірленді. Суда жоғары молекулалы полиакрил полимерінің дисперсиясы болып табылады. Жануарлардан алынатын компоненттер жоқ. Оны кейбір вакциналарда, әсіресе, шошқа мен ІҚМ үшін пайдалану ұсынылады [3].

*Montanide*TM адьюванттары және олардың компоненттері иммунологиялық рецептураларда қолдану кезінде ветеринариялық медициналық өнімдер жөніндегі қауіпсіз Комитет (CVMP) ретінде қарастырылады және ең төменгі қауіп деңгейін одан әрі зерттеуді талап етпейтін (MRL) №470/2009 (бұрын 2377/90/EC) Еуроодақ регламентінің қосымшасына рұқсат етілген заттар ретінде енгізілді.

Ет сапасы және жануарларды ұстау шарттары бойынша нормативтер вакциналардың қасиеттеріне тиісті талаптар қояды. Вакцинаның адьювант жүйесі үшін оның физикалық-химиялық қасиеттеріне сәйкес вакцинаның тиімділігі, қауіпсіздігі және экономикалық тиімділігі арасында ең жақсы ымыраға келу мақсатында вакцинаның антигені мен рецептурасын арнайы дайындайды.

Вакцинаны әзірлеу кезінде тиісті адьюванттың технологиясын таңдау дала жағдайында табысты вакцинациялауды қамтамасыз ететін маңызды сәттердің бірі болып табылады. Адьюванттың формуласын таңдау кезінде антиген түрі, мақсатты жануар, мақсатты иммундық жауаптың ерекшелігі мен кинетикасы сияқты маңызды критерийлерді ескеру қажет.

Seppic компаниясы вакциналарды әлемдік өндірушілермен тығыз ынтымақтастықта 30 жыл бойы ветеринариялық вакциналарға арналған адьювант әзірлейді және өндіреді. *Seppic* адьюванттардың тегін үлгілерін ұсына отырып, сондай-ақ жануарлардың патологиясы мен түріне сәйкес ТМД елдерінің нарығы үшін ең қолайлы адьюванттарды таңдауға көмектесу арқылы ветеринариялық вакциналар саласындағы әзірлемелерді қолдайды. Бұдан басқа, *Seppic* зертханалық зерттеулер кезінде де, өнеркәсіптік өндіріс кезеңінде де вакциналардың рецептураларын әзірлеуге және оларды сынауға көмектеседі.

Қазіргі уақытта ШРПС қарсы вакциналардың антигендік белсенділігін бақылау үшін бірыңғай стандарт жоқ. ШРПС қарсы вакциналарды өндіруші компаниялардың көпшілігі вакциналардың антигендік белсенділігін иммуноферменттік талдауда (ИФТ) зерттеу немесе иммунофлуоресценция реакциясында (РНИФ) егілген жануарлардың қан сарысуын иммунофлуоресценциядан кейін 3-4 апта өткен соң бақылайды. Иммунизацияланған жануарларды бақылау әдістері зерттеу мақсатында ғана пайдаланылады және биопрепараттарды ағымдағы бақылау үшін қолданылмайды.

PROGRESSIS инактивирленген вакцинасын өндіретін Merial (Франция) компаниясы егілген торайларда иммунизациядан кейін жануарларды ШРПС-нан қорғауда маңызды рөл атқаратын IFN-γ деңгейі айтарлықтай ұлғаюын анықтады. Алайда, өндіріс кезінде бұл компания тек РНИФ-те сарысулық антиденелерді бақылаумен шектеледі, олардың деңгейі екі рет вакцинациядан кейін кемінде 2,5 lg флуоресцирленетін бірліктен (IF-U) болуы тиіс [4].

Қазіргі уақытта ЖДДСҰ-ның жалпы талаптары негізінен тек қана ШРПС-на қарсы тірі вакциналар үшін анықталған. Оларға сәйкес, ШРПС қарсы тірі вакциналар тұрақты, зиянсыз болуы, егілген жануарларды аурудың клиникалық көрінуінен сақтау және егілген торайлардағы иммунитеттің ұзақтығын

нарықтық кондицияға жету жасына дейін (союға дейін) қамтамасыз етуі тиіс. ШРРС қарсы вакцинациялау тек ШРРС-оң табындарда ұсынылады. Вирустың титрін вакцина дозасында бақылау кезінде вакцинаның иммуногендігін тестілеу кезінде қолданылатын вирус титрімен салыстырғанда кем дегенде 1-2 lg-ға жоғары болуы тиіс (яғни бақылау жұқтырудан қорғайтын препараттағы вирустың ең аз титрімен) [5].

"Жануарлардың Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ЖДДСҰ) басшылығына" сәйкес [6] ШРРС вирусының антигендерін инактивирленген вакциналарды дайындау үшін формальдегидпен немесе этиленминнің туындыларымен инактивациялау ұсынылады. Контаминацияның болмауы, зиянсыздығы және т. б. сияқты барлық вакциналық препараттарға қойылатын жалпы талаптардан басқа, ШРРС -на қарсы инактивацияланған вакциналар аурудың репродуктивті моделіндегі шошқалардың тиімділігіне қатысты сыналануы тиіс. Бұл үшін иммунизацияланған шошқаларды 85 күн супорос вирусымен жұқтыру ұсынылады, бұл ретте егілген малдарда аурудың клиникалық белгілері байқалмауы тиіс және төлдің көрсеткіштері (әлсіз, өлі, мумифицирленген жемістердің тууы) бақылаудағы малдардан айтарлықтай ерекшеленуі тиіс.

Осылайша, жалпы эпизоотиялық үдерісті талдау, Жануарлардың Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы ақпаратының деректері және осы мәселе бойынша жарияланымдардың негізінде, сондай-ақ республика аумағында Еуропалық және Солтүстік Америка генотиптері ШРРС ошағының болуы, енгізу жолдары және қабылдағыш мал басының болуы ШРРС қарсы бивалентті инактивацияланған вакцинаны әзірлеуге негіз береді.

2 Материалдар мен әдістер

2.1 Материалдар

Вирус. Жұмыста PCCC вирусының келесі штаммдары қолданылды:

- «Arterivirus/LKZ/2010» инфекциялық белсенділігі бар американдық генотип ($5,75 \pm 0,00$) Ig тцд50/мл 2010 жылы Жамбыл облысында бөлінген;
- «Kostanay-CM/08» еуропалық генотип ($6,13 \pm 0,13$) Ig тцд50/мл белсенділігі бар 2008 жылы Қостанай облысында бөлінген;
- «NADC-8» Ұлттық жануарлар аурулары орталығының (Эймс к., АҚШ) қызметкерлерінің XFTO пилоттық жобасы шеңберінде ұсынылған;

Вакцина. Неміс фирмасының тірі құрғақ вакцинасы (25.01.17 ж. шығарылған, флаконда 50 доза, Импран*ФЛЕКС сұйылтқышы бар, 100 мл вакцинаға арналған) "Репроцик" PRRS EU;

«Progressis» Мериал француздық вакцина фирмалары (14.06.17 ж. шыққан, флаконда 25 доза).

Жануарлар. Тәжірибе кезінде 2-4 айлық 52 бас торайлар, ШРРС бойынша қолайлы шаруашылықтардан 3 бас шошқалар және 50 бас зертханалық ақ тышқандар қолданылды.

Жасушалар мәдениеті. ШРРС вирусының штаммдарын өңдеу үшін MARC-145 жасушаларының ауыстырып тиелетін желісі пробиркаларда өсірілген, 96-сәулелі культуральды планшеттерде (көлемі 200 мкл) және ыдыстарда, олардың көлемінің 1/7-не жасушалық суспензиямен толтырған кезде сыйымдылығы 1,5 л болатын ыдыстар (макака-резусМА-104 эмбрион бүйрек жасушаларының клондық нұсқасы) қолданылды.

Қоректік орта. MARC-145 жасушаларының дақылдарын өсіру үшін стандартты жазбасы бойынша (БҚПҒЗИ) Игла қоректік ортасы негізінде өсу ортасын пайдаланды. Қалыптасқан жасушалық моноқабатты жуу Хенкс ерітіндісімен жүзеге асырылды. Сонымен қатар, жұмыста бактериялық орта қолданылды: ет-пептон агары (ЕПА), ет-пептон сорпасы (ЕПС), Сабуро (қатты және сұйық) және тиогликоль ортасы.

2.2 Әдістері

2.2.1 MARC-145 жасушалық культурасында ШРРС вирусының өсіру

MARC-145 жасушаларының ауыстырып тиелетін дақылдарында ШРРС вирусын өсіру үшін тұрақты жағдайда культуралды матроста (көлемі 1,5 л), пробиркада (көлемі 1,0 мл) және 96-сәулелі дақылдық планшеттерде (көлемі 200 мкл) өсірілген 48-72 с моноқабатты дақылдарды пайдаланды. Жасушалар өсіндісін жұқтырар алдында бойлық ортаны құйып, моноқабатты стерильді Хенкс ерітіндісімен жуады. Содан кейін жасушалар дақылы ШРРС вирусын жұқтырып, вирустың адсорбциясы үшін термостатқа немесе CO₂ инкубаторға 1 сағатқа орналастырады. Күн сайын 3-7 тәулік бойы ыдыстарда бақылау

жүргізілді (жарықты микроскопия), цитопатикалық әсердің басталу мерзімін атап өтті (ЦПӨ). Сақтау және одан әрі пайдалануға арналған айқын цитопатикалық өзгерістері бар ыдыстар минус 40 °С температурада мұздатылды.

2.2.2 Вирустың жұқпалы титрін анықтау

Вирустың жұқпалы титрін анықтау жалпы қабылданған әдістеме бойынша жүргізілді. Вирус титрі J., Muench H.A. ReedI әдісі бойынша есептелді [25] lg ТЦД₅₀/мл-де білдірді.

2.2.3 Инактиванттың жұмыс ерітіндісін дайындау

ШРРС вирусын инактивациялау үшін ветеринарлық биотехнологияда қолданылатын ДЭИ инактиванты (15%) пайдаланылды.

Еріткіш ерітіндісі коммерциялық препаратты тікелей пайдаланған күні 0,15% - ға дейін стерильді дистилденген сумен араластыру жолымен дайындалған.

Мысал: бастапқы ДЭИ мазмұны 15% құрайды. 0,15% ерітіндіні дайындау үшін келесі формула бойынша есеп жүргізілді:

$$X = \frac{0,15 \times 100}{15} = 1 \quad (1)$$

0,15% ДЭИ дайындау үшін есептелген инактиванттың (X) мөлшері, бұл жағдайда 1,0 мл 100 мл-ге дейін стерильді дистилденген сумен жүргізілді.

2.2.4 ШРРС вирусының инактивациясы

Бірінші серияда құрамында вирусы бар материалдарды инактивациялау процесі 0,1% су ерітіндісімен (рН 7,6-7,8) димерэтиленимин (ДЭИ) (22 ± 2) °С температурада 30 сағат бойы кезеңді араластыру арқылы (әр 2 және 3 сағ сайын 3-5 мин) жүргізілді. Бұдан әрі вакцинаның бірінші сериясындағы иммуногенділігінің төмен болуына байланысты екінші сериядағы материалдар инактиванттың неғұрлым жоғары концентрациясы (0,15% ДЭИ су ерітіндісі) және әр 2 және 3 сағат сайын 3-5 минуттан кейін мерзімді араластыру арқылы қысқартылған экспозициямен (12 сағат) активтендірілді.

Инактивация уақыты аяқталғаннан кейін суспензиядағы ДЭИ қалдық әсері соңғы концентрацияда 0,15% натрий тиосульфатын қосу жолымен бейтараптандырды, содан кейін (4 ± 1) °С дейін салқындатылды.

2.2.5 ШРРС вирусы штамдарының концентрацияланған суспензиясын алу

Алынған инактивирленген суспензияның авирленттілігін тексергеннен кейін «Millipore» компаниясы шығарған «Pellicon» ультрафилтрациялық жүйесінде тангенциалды ағында сүзу әдісімен штамдар антигендерінің

концентрациясын жүргізді. Жүйе сүзгісі бар камерада және перистальтикалық сорғыдан тұрады. Камераға кіретін сұйықтықтарды жинайтын және оларды мембраналардың параллель қабаттары арқылы тангенциальді-ағынды түтікшелерге тарататын рамалы пластиналар кіреді. Мембрананың диаметрі молекулалық массамен 200 кД акуыздарды сүзуге мүмкіндік береді.

2.2.6 ШРРС вирусының инактивациясының толықтығын анықтау әдістемесі

Вирус инактивациясының толықтығы MARC-145 жасушаларының мәдениетінде үш «соқыр» жүйелі жолаушы өткізу жолымен анықталды. Стерильді пробиркаға 0,5 см³ инактивирленген вирус және 4,5 см³ Игла қоректік ортасын енгізді. Пробирканың ішіндегісін 15 с араластырды, және MARC-145 1 см³ жасушалар өсірінділерінің 2-ші тәулік толық моноқабаты бар 5 пробиркаға енгізді. Содан кейін моноқабатты екі рет ИГЛА ортасымен (2 см³) жуады. Осыдан кейін пробиркаларға 1 см³ қоректік орта құйылып, (37 ± 0,5) °C температурада 5-6 тәулік бойы инкубацияланды. Келесі пассажды жүргізу үшін жасушалардың сыналатын дақылдарын минус 70 °C температурада мұздатқан, бөлме температурасында ерітілген және пробиркалардың ішіндегісін MARC-145 (2 пассаж) жасушаларының дақылдарына тасымалдаған. Сыналатын дақылды (37 ± 0,5) °C температурада 5-6 тәулік бойы инкубациялаған. Антиген MARC-145 жасушаларының культурасында ерекше ЦПӘ болмаған кезде қатарынан үш пассаж бойы толық инактивацияланған деп саналды.

2.2.7 Вакцинаның вирустық шикізаты мен эксперименттік үлгілерінің стерильділігін бақылау

Бактериялық және саңырауқұлақты микрофлорамен бивалентті инактивирленген вакцинаның вирустық шикізаты мен эксперименттік үлгілерінің контаминациясының болмауын бақылау ГОСТ 28085-89 «Биологиялық препараттар. Стерильдікті биологиялық бақылау әдістері».

2.2.8 ШРРС қарсы вакцинаның эксперименталды үлгісін жасау

Еуропалық және солтүстікамерикандық генотиптердің ШРРС қарсы инактивирленген бивалентті вакцинаның эксперименттік үлгісін жасау адьюванттың MontanideTM GEL 01 техникалық бюллетеніне сәйкес бірінші сериядағы салмақ қатынасында: 1:9 (10%), ал екінші сериядағы 1:5 (20%) жүргізілді. Тұрақты Рецептураны алу үшін Сулы антигендік ортаны MontanideGEL 01 ST-де бөлме температурасында және 5-10 мин бойы қалыпты араластыру үшін сұйылтылды.

2.2.9 Вакцинаның зиянсыздығын анықтау

Бивалентті вакцина үлгілерінің зиянсыздығын анықтау үшін әрбір серия үшін салмағы 18-20 г 20 ақ тышқандар пайдаланылды, бұлшықет ішіне 0,2 мл/гол көлемінде енгізілді. Бұлшық етке 10 тәулік бойы бақылау жүргізілді, содан кейін оларды өліп, патологоанатомиялық сою және енгізу орнын тексеру жүргізілді.

2.2.10 Жануарларды жұқтыру, қан сынамаларын іріктеу

Вакцина мен жануарларға бақылау вирусы бұлшықет ішіне мойынның үштен бір бөлігіне тәжірибе мақсатына байланысты 2 немесе 4 мл/гол көлемінде 2-3 см тереңдікке енгізді.

Тәжірибелі жануарлардан қан сынамасын алу

Малдардан қан сынамасы краниальды көктамырдан алынды. Қан сарысулары мен плазмасын стандартты әдіспен алды. Қан сарысуын антиденелердің болуына зерттеу алдында термолабильді ингибиторларды жою үшін 56 °C температурасында 30 минут бойы инактивациялады.

2.2.11 Серологиялық зерттеулер

Бивалентті инактивирленген вакцинаның эксперименталды үлгілерінің антигендік белсенділігі *BioNote*(Корея) және «ШРРС-СЕРОТЕСТ» ЖШҚ «Ветбиохим», Мәскеу қ., РФ, «ШРРС-СЕРОТЕСТ» *AniGenPRRSAntibody* фирмасының ИФТ жиынтықтарын пайдалана отырып, ерекше антиденелердің болуына байланысты анықталды, олардың қойылуын олардың өндірушілердің ұсыныстарына сәйкес жүзеге асырды.

2.2.12 Вакцинаның иммундау дозасын және иммунитет басталу мерзімін вакциналанған шошқаларда анықтау

Montanide Gel 01 ST адъюванттың негізінде ШРРС қарсы инактивирленген бивалентті вакцинаның эксперименталды үлгілерінің иммундау дозасын анықтау тәжірибесінде 2 және 4 мл вакцинаның келесі дозалары сыналды. Осы мақсаттар үшін 2-4 айлық 12 гол мөлшерінде бояулар қолданылды. Иммундық статусты ИФТ-да егілген жануарлардың қан сарысуындағы арнайы антиденелер деңгейі бойынша бағалады.

Жануарлардың қаны әрбір 3 тәулік сайын алынды(3, 6, 9, 12, 16 (*BioNote* фирмасының жинағы, Корея).

2.2.13 Сақтау кезінде вакцинаның сақталуы

Инактивирленген бивалентті вакцинаның сақталуын анықтау үшін (6 ± 2) °C температурада үлгілік сақталған ШРРС-на қарсы 6 айлық вакцинаға 3-ші жөндеу шошқаларына егілді. Вакцинаны бұлшықет ішіне 4,0 мл көлемінде бір рет енгізген. Барлық вакцина егілген жануарлардың қанынан спецификалық

антиденелердің деңгейін анықтау үшін 12, 14, 17, 24, 30, 40, 45, 48, 55 ИФТ тәулік (бақылау мерзімі) сарысу алынды (*BioNote* фирмасының жинағы, Ю. Корея, «ШРРС-СЕРОТЕСТ» ЖШҚ «Ветбиохим», Мәскеу қ., РФ).

2.2.14 Эксперименттік деректерді статистикалық өңдеу

Барлық эксперименттер дұрыс нәтижелер алуды қамтамасыз ететін қайталаулар санымен жүргізілді. Эксперименталды деректерді статистикалық өңдеу «*GraphPadPrism 7*» компьютерлік бағдарламасының көмегімен орташа арифметикалық мәнді ($\bar{X}$) және квадраттық қатені (m) есептеумен жүргізілді.

3 Зерттеу нәтижелері

Отандық бивалентті инактивацияланған вакцина дайындау технологиясын әзірлеу үшін шошканың репродуктивті-респираторлық синдромы вирусының еуропалық және солтүстікамерикандық генотиптеріне қарсы иммуногендік вакцина дайындау технологиясын іздеу бойынша зерттеулер жүргізілді. Бұл ретте, құрамында 20% *Montanide Gel 01*, адьюванты бар шошқалардың репродуктивті-респираторлық синдромы штаммдарының концентрацияланбаған вирусы бар суспензия негізінде дайындалған вакцинаның бірінші сериясы жануарларға иммундық иммунитеттің басталу мерзімін және ұзақтығын анықтау бойынша жүргізілген зерттеулер барысында әлсіз болып шықты. Осыған байланысты дайындау технологиясының жекелеген кезеңдеріне өзгерістер енгізе отырып, вакцинаның жаңа сериясы жасалды. Алынған вакцина сериясы иммуногендік қасиеттерін зерттеу үшін қолданылған. Бұл ретте вакцинаның иммундау дозасы, егілген малдарда иммунитеттің басталу мерзімі мен ұзақтығы, сондай-ақ сақтау кезінде зиянсыздығы мен сақталмауы анықталды.

3.1 Бивалентті инактивирленген вакцина дайындау технологиясын, оңтайлы биожүйені және оларды өсіру үшін, жағдайларды әзірлеу үшін ШРРС вирусының өзекті штамдарын таңдау

БЖҚҒЗИ микроорганизмдер коллекциясында ШРРС вирусының 3 эпизоотиялық штаммы сақталады: солтүстікамерикалық генотиптің «*NADC-8*», еуропалық генотиптің «*Kostanay-CM/08*» және солтүстікамерикалық генотиптің «*Arterivirus/LKZ/2010*».

Штаммдарды инактивирленген бивалентті вакцина дайындау үшін әлеуетті кандидат ретінде іріктеу кезінде Қазақстан үшін өзекті вирус штаммдарына, яғни республиканың қолайсыз шаруашылықтарының ауру малдарынан тікелей бөлінген.

ШРРС вирусының оқшауламалары генетикалық және антигендік ерекшеліктер бойынша 2 генетикалық топқа бөлінетінін ескере отырып: Солтүстік Америка (Солтүстік Америка және Оңтүстік-Шығыс Азия елдері) және еуропалық (Еуропа елдері, оның ішінде Ресей).

Сондай-ақ жануарлардың Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының тізіміне енгізілген аса қауіпті аурулар қоздырғыштарының әлемдік дәстүрлі «инкубаторларына» тікелей жақын орналасқан біздің еліміздің географиялық жағдайын ескеру қажет. Сонымен қатар, жақында АҚШ - та, Канадада және Қытайда, ал Америкада-Словакияда вирустың еуропалық генотипін шошқадан оқшаулау туралы мәліметтер алынды, вакцина құрамында екі генотиптерді (американдық және еуропалық) пайдалану қажеттілігін дәлелдейді.

Осылайша, отандық инактивирленген бивалентті вакцина дайындау үшін Еуропалық генотипінің «*Kostanay-CM/08*» және солтүстікамерикалық

генотиптің «Arterivirus/LKZ/2010» ШРРС вирусының қазақстандық штаммдары таңдалды.

3.1.1 ШРРС вирусының штаммдарының культуральды суспензиясын алу

Көптеген зерттеушілердің айтуынша, вирусты массаның ең жоғары шығуын жинау вирустың репродукциясы үшін оңтайлы жағдайларға жеткенде сәтті болады, онда негізгі факторлар инфекциялаушы дозаның көптігі, инкубациялау температурасы, қолдаушы орта, қолдаушы ортада қан сарысуының концентрациясы және т. б. болып табылады.

Осыған байланысты «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штаммдарының репродукциясын зерттеу бойынша көптеген инфекциялаушы дозаға байланысты *MARC-145* жасушалар культурасында ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штамдарының репродукциясын зерттеу бойынша эксперименттер сериясы өткізілді. Ол үшін 3 тәулік *MARC-145* жасушалардың пробиркалы дақылдарын 0,001-ден 1,0 ТЦД₅₀/кл.-ға дейінгі көптігі бар ШРРС вирусының зерттелетін штаммдарымен жұқтырды, вирустың адсорбциясынан кейін ($37 \pm 0,5$) °C температурада 1 сағат бойы вирустары бар материалды алып тастады, қолдаушы ортаны енгізді және ($37 \pm 0,5$) °C вирус-жасушалар жүйесін инкубациялады. Күн сайын сәулелі микроскопия арқылы вирустың ЦПӨ болуына жасушалық моноталшықтың жағдайына бақылау жүргізді.

Жасушалар өсіндісінде ШРРС вирусының зерттелетін штаммдарының жинақталу динамикасын вирустың әртүрлі дозаларын жұқтырғаннан кейін алынған культуральды суспензияның титрлеу деректері бойынша зерттелді.

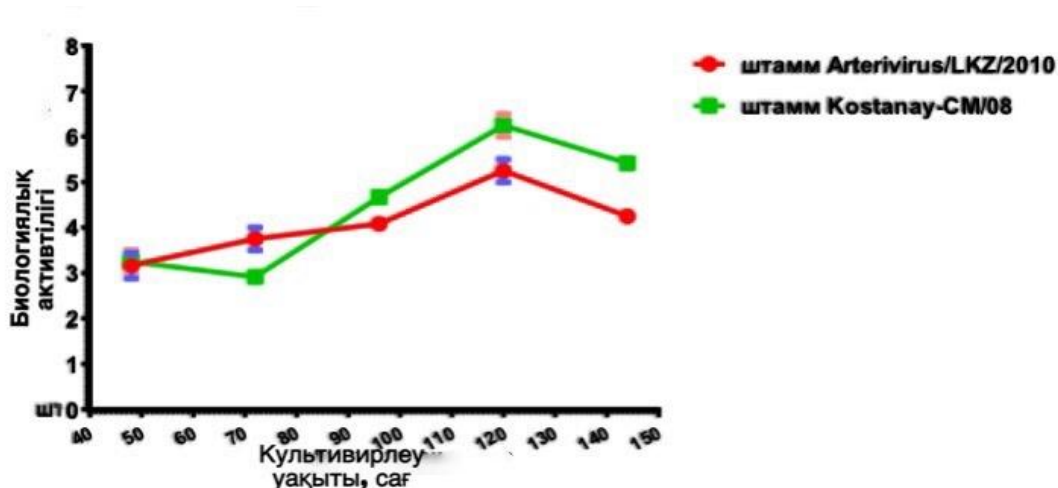
1 Кесте - Инфекциялаушы дозаның көптігіне байланысты *MARC-145* жасушалар культурасында ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штамдарының жинақталу деңгейі

ШРРС вирус штаммының атауы	Инифицирленуші вирустың дозасы, ТЦД ₅₀ /клеткада	Вирусты культивирлеу мерзімі, тәулік	Вирустың инфекциялық белсенділігі, lg ТЦД ₅₀ /мл ($X \pm m$)
Arterivirus/LKZ/2010	0,001	5-7	3,83±0,08
	0,01	5-7	4,25±0,14
	0,05	4-5	5,25±0,08
	0,1	4-5	5,33±0,08
Kostanay-CM/08	0,01	4-5	4,08±0,16
	0,05	4-5	5,42±0,08
	0,5	3-4	6,25±0,08
	1	3-4	6,33±0,08

1-кестеде ұсынылған деректерден «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штамдарының максималды жинақталуы ШРРС вирусының культивирленген титрлі жүйесінде ($5,25 \pm 0,08$) lg ТЦД₅₀/мл және ($6,25 \pm 0,08$)

Ig ТЦД₅₀/мл инфекцияланатын мөлшерде (0,05-0,1) ТЦД₅₀/мл және (0,5-1,0) ТЦД₅₀/мл мөлшерде байқалады. Алайда алынған деректерді статистикалық өңдеу кезінде (0,05-0,1) ТЦД₅₀/мл және (0,5-1,0) ТЦД₅₀/мл сыналған штаммдардың дозалары арасындағы елеулі айырмашылық байқалмаған ($P>0,5$). Осыған байланысты, MARC-145 жасушалық желісінде «Arterivirus/LKZ/2010» штаммының белсенді вирусы бар суспензиясын алу үшін антигендік материалға шығындарды азайту мақсатында жасушаларды 0,05 ТЦД₅₀/мл вирус дозасымен, ал «Kostanay-СМ/08» штаммы үшін 0,5 ТЦД₅₀/мл вирус дозасымен жұқтыру орынды болды.

«Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штамдарын өсіру мерзімін анықтау үшін MARC-145 жасушаларының культурасын 0,05 ТЦД₅₀/мл және 0,5 ТЦД₅₀/мл дозаларында жұқтырды, әрі қарай $(37 \pm 0,5)$ °C температурада инкубацияланды. Вирустың титрін анықтау үшін вирусы бар сұйықтықтың сынамасын алды. Зерттеу нәтижелері 1 суретте көрсетілген.



1 Сурет - ШРРС вирусының штамдарын өсіру мерзімдері

1-суретке сәйкес жасушалар өсіндісінде ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штаммдарының жиналуы инкубациялаудың барлық сыналған мерзімдерінде болды, алайда ең үлкен титрлерде 120 сағат инкубациялауда жинақталды, онда вирустың жұқпалы титрі Ig ТЦД₅₀/мл $(6,25 \pm 0,25)$ Ig ТЦД₅₀/мл-ге $(5,25 \pm 0,14)$ жетті. Оларды 144 сағатқа дейін одан әрі инкубациялау олардың белсенділігінің тиісінше 1,00 және 0,83 Ig ТЦД₅₀/мл-ге төмендеуіне алып келді.

Сезімтал жасушалық жүйеде қоздырғыштың репродукциясын қамтамасыз ететін жоғары белсенді вирусы бар материалдарды алу кезінде маңызы зор. «Arterivirus/LKZ/201» штаммдарының $(5,75 \pm 0,08)$ Ig ТЦД₅₀/мл және Ig ТЦД₅₀/мл «Kostanay-СМ/08» $(6,33 \pm 0,08)$ Ig ТЦД₅₀/мл вирусының ең көп жинақталуы үшін өсірудің стационарлық тәсілі кезінде MARC-145 жасушаларының культурасында $(37 \pm 0,5)$ °C температурада және демеуші орта құрамында қан сарысуының 5% болғанда жүргізу қажет екендігі анықталды.

Осылайша, жүргізілген зерттеулердің нәтижелері MARC-145 жасушалар культурасында өсірудің оңтайлы параметрлерін анықтауға мүмкіндік берді. Бұл

ретте ШРРС вирусының белсенді биомассасын алу үшін жасушалар мәдениетін тиісінше 0,05 және 0,5 ТЦД₅₀/кли дозаларында ($37 \pm 0,5$) °С температурада 120 сағат бойы иненің қолдаушы ортасы құрамында ІҚМ қан сарысуының 5% концентрациясы бар стационарлық әдіспен инкубациялау қажет.

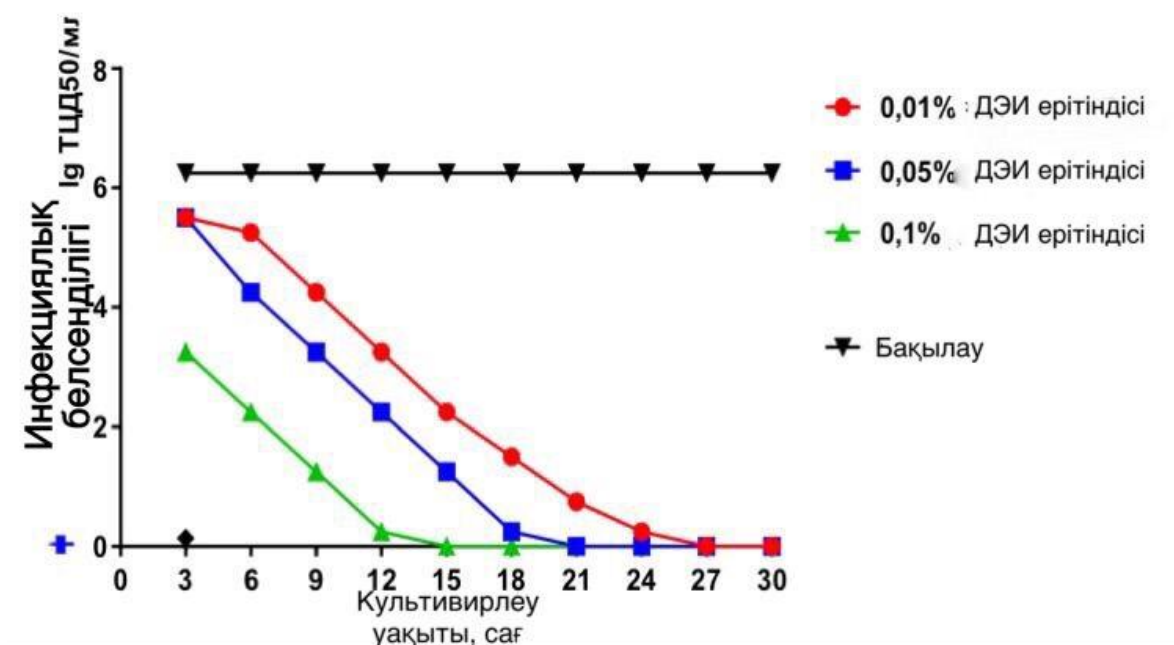
Вакцинаның бірінші сериясын дайындау үшін егудің пысықталған шарттары бойынша тиісінше «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» ШРРС вирусының инфекциялық белсенділігі ($5,25 \pm 0,14$) lg ТЦД₅₀/мл және ($6,33 \pm 0,08$) lg ТЦД₅₀/мл болатын «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штаммдарының 2000 мл культуральды суспензиясы жасалды. Содан кейін олардың негізінде вакцина дайындау технологиясының келесі кезеңдерін өңдеу бойынша зерттеулер жүргізілді.

3.2 Тиімді инактивантты таңдау және ШРРС вирусын инактивациялаудың оңтайлы параметрлерін өңдеу

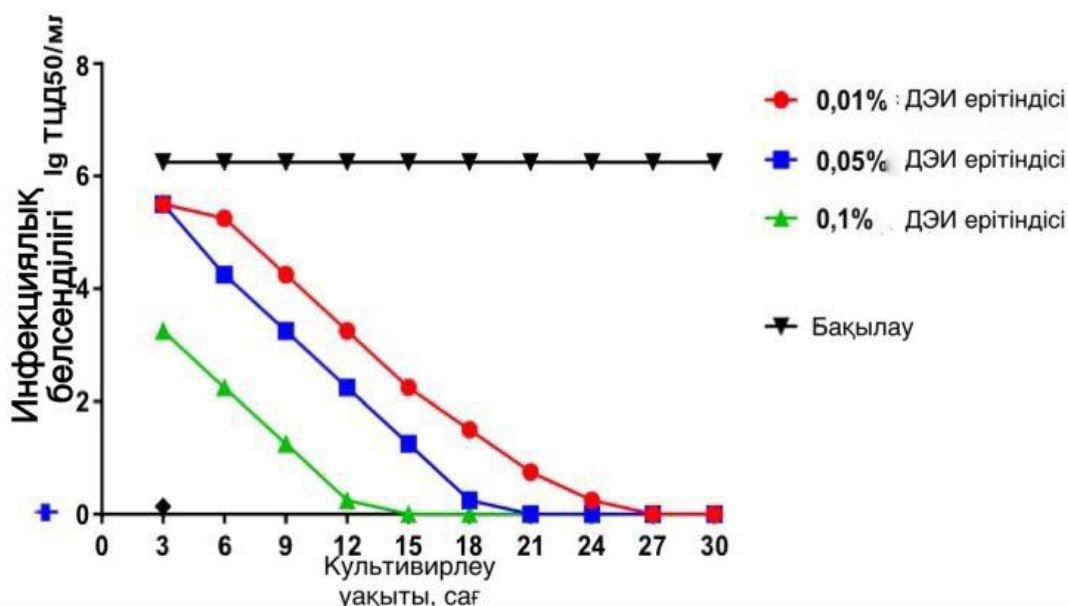
Димерэтилениминді (ДЭИ) ШРРС вирусының штаммдары үшін инактивант ретінде таңдау бірқатар шетелдік әдеби көздерде [1, 2, 9], сондай-ақ біздің мәліметтерімізге сәйкес ДЭИ антигендік қасиеттерді барынша сақтай отырып, вирустың инфекциялығын толық айыру қабілетіне негізделген.

ШРРС вирусының инактивациялау параметрлерін өңдеу мақсатында тәжірибелер ДЭИ инактивантын және инфекциялық белсенділігі ($5,25 \pm 0,14$) lg ТЦД₅₀/см³ және ($6,33 \pm 0,08$) lg ТЦД₅₀/см³ ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штаммдарының нативті вирусы бар ағартылған материалдарын пайдалана отырып жүргізілді.

ДЭИ 0,01, 0,05 және 0,1% шоғырлануын пайдалана отырып вирустың инактивациясының кинетикасын эксперименттерде анықтады, олардың нәтижелері 2 және 3-суретте көрсетілген.



2 Сурет - ШРРС вирусының (22 = 2,0) °C температурада ДЭИ пайдаланған кезде «Arterivirus/LKZ/2010» штаммының инактивация кинетикасы



3 Сурет - ШРРС вирусының (22 = 2,0) °C температурада ДЭИ пайдалану кезінде «Kostanay-СМ/08» штаммының инактивация кинетикасы

2 және 3-суреттерде келтірілген алынған деректер, ШРРС вирусы штаммдарының инфекциялық белсенділігінің ДЭИ әсерінен төмендеуі тік сызықты түрде болғанын куәландырады. Бұл ретте ДЭИ соңғы концентрациясында 0,01% «Arterivirus/LKZ/2010» штаммының үлгілерін 30 сағат ішінде толық инактивациялауды шақырды.

Алынған нәтижелерге сүйене отырып, ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штаммдарының ДЭИ неғұрлым оңтайлы шоғырлануы тиісінше 18 және 15 сағ экспозициясы 22 °C болғанда 0,1% болып табылады. Құрамында вирусы бар материалды барынша сенімді инактивациялау үшін экспозиция ШРРС вирусының екі штаммдары үшін екі рет 30 сағатқа дейін ұлғайтылды.

3.2.1 ШРРС вирусының инактивирленген, ағартылған суспензиясын алу\

ШРРС вирусының активті биомассасын 450 мл суспензиядан алу үшін штаммдар 0,1% ДЭИ ерітіндісімен 30 сағат бойы әр 2-3 сағат сайын 3-5 минуттан кейін кезеңдік араластыру арқылы белсендірілді. ескерту.

«Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штаммдарының суспензиясын инактивациялаудың толықтығы *MARC-145* жасушаларының өсіндісінде активтендірілген материалдарды үш рет жүйелі түрде пассирлеу жолымен анықтады. Зерттеулер көрсеткендей, *MARC-145* жасушаларының өсінділерін 10 тәулік бойы ШРРС вирусының екі штаммының да белсенді суспензиямен (30 сағат бойы 0,1% ДЭИ) жұқтыру кезінде бақылау, 3 есе пассирлеу кезінде моноқабаттың деструктивті өзгерісі байқалмады.

Осылайша, жалпы көлемі 800 мл еуропалық және солтүстікамерикандық генотиптердің ШРРС вирусының ДЭИ суспензиясының көмегімен активтендірілген штамдары алынды.

Авируленттілікті тексергеннен кейін 20 мин ішінде 3000 айн/мин кезінде центрифугалау әдісімен алынған инактивирленген суспензияны жарықтандыру жүргізілді.

4 Зерттеу нәтижелерін қорытындылау және бағалау

Қазір шошқа өсіру өнеркәсібі дамыған әлемнің көптеген елдерінде жануарларды иммундау үшін ШРРС-на қарсы инактивирленген вакцина қолданылады. Осының бәрі қауіпсіз және тиімділігі жоғары инактивирленген препараттарды жасау өте нақты екенін көрсетеді. Осыған байланысты, біздің зерттеулеріміздің мақсаты ШРРС вирусының жергілікті штамдары негізінде шошқаның репродуктивті-респираторлық синдромына қарсы отандық бивалентті инактивацияланған вакцинаны дайындау технологиясын әзірлеу болып табылады. Осы жобаны орындау кезінде біздің иелігімізде үш штамм болды, олардың екеуі біздің республикамыздың аумағында бөлінді және үшінші штамм бұрын АҚШ-тан ХГТО жобасы шеңберінде алынды.

Вирустарды өсіру табыстылығы, ең алдымен, жасушалық субстраттың табысты таңдауына байланысты. Бұл ретте вирустың және вирусты антигеннің жоғары шығуы, егу жағдайларына қатысты қарапайымдылық және вакцинаның қауіпсіздігі негізгі критериялар болып табылады. Кейбір вирустар әртүрлі текті жасушалардың дақылдарында жақсы көбеюде, басқалары – табиғи иесінің жасушаларын немесе сараланған жасушаларды көреді, немесе өсірудің ерекше жағдайларын (төмен температураны, жоғары немесе төмен жұқтырудың көптігі) талап етеді, үшіншісі – ағзадан тыс жерлерде әлі көбею мүмкін емес [17].

Вирус өнімдерінің көбеюі, әсіресе вирусты препараттарды жаппай өндіруде үлкен практикалық қызығушылық болып табылады. Вирустардың репродукциясына және жасушалар мәдениетінде вирустық антигендердің жиналуына әртүрлі факторлардың әсерін зерттеуге көптеген зерттеулер арналған. Бұл оңтайландыру маңызды технологиялық мәнге ие бірқатар жағдайларға байланысты болып шықты.

Вирустардың температуралық шектері мен көбеюінің температуралық оптимумы вирустық геноммен бақыланады, бірақ олар жасушалық жүйеге де байланысты. Алайда, бұл ережеден ерекше жағдайлар бар [18]. Біз ШРРС вирусының зерттелген штамдарын өсіру үшін оңтайлы температура ($37 \pm 0,5$) °C болып табылатынын анықтадық.

Вирустың мәдениетте жиналуы вирустың жиналу ұзақтығына, сондай-ақ оның өнімділігіне әсер ететін көптеген жұқтыруға байланысты. Бір қабатты дақылдарды жұқтыру үшін вирусты жинақтау мақсатында әдетте бір торға 0,001-0,1 ТЦД₅₀ қолданылады ($M = 0,001-0,1$). Бұл ретте вирустың мәдениетте жиналуы көп циклды репродукцияның жиынтық нәтижесі болып табылады. Өміршендігі тез төмендейді, ал вирустардың репродукцияның қысқа циклі болмаса, көптеген жұқтырудың маңызды мәні бар [19]. Тиімді инфекциялаушы дозаны анықтау бойынша зерттеулерде ШРРС вирусының штамдары үшін жұқтыру дозасы жасушаға 0,05 және 0,5 ТЦД₅₀ құрады.

In vitro вирустарын өсіру кезінде маңызды фактор сезімтал жасушалық жүйеде қоздырғыштың репродукциясын қамтамасыз ететін культуралды ортаның маңызды компоненттерінің бірі ретінде жануарлардың қан сарысуы

ортасында болуы болып табылады. ІҚМ қан сарысуының концентрациясының иненің қолдаушы ортасының құрамында ШРРС вирусының репродукциясына әсерін зерттеу бойынша эксперименттерде вирустың жоғары титрде жиналуы қолдаушы ортаның құрамында қан сарысуының 5% болғанда жүргізілетіні анықталды. Осыған байланысты одан әрі зерттеулер жүргізу үшін біз инелер ортасының құрамында Сарысудың 5% концентрациясын қабылдадық, өйткені бұл концентрация вирусты өсірудің бүкіл мерзімі ішінде жасушалық моноталдықтың тұрақтылығын және оның осы культуралдық жүйедегі репродукцияның ең жоғары деңгейін қамтамасыз етеді.

Осылайша, *MARC-145* жасушалары өсіндісінде ШРРС вирусын өсірудің өңделген параметрлерін сақтау бивалентті вакцина технологиясын әзірлеу үшін жоғары белсенді вирусты құрайтын суспензияны жасауға мүмкіндік берді. *MARC-145* жасушаларының культурасында ШРРС вирусының өсіру параметрлері бойынша алынған нәтижелер әдебиет мәліметтерімен келісіледі [21].

ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штамдарын инактивациялау тәжірибелерінде біз ДЭИ 0,01, 0,05 және 0,1% концентрацияларында сынадық. Бұл ретте ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-CM/08» штамдары үшін инактиванттың неғұрлым оңтайлы концентрациясы тиісінше 22 °C кезінде 15 және 18 сағат бойы экспозициясы бар ДЭИ 0,1% болып табылатыны анықталды. Жоғарыда көрсетілген концентрацияларды пайдалану кезінде зерттелетін үлгілердің толық инактивациясына қол жеткізілді, бұл сондай-ақ барлық *MARC-145* жасушалар культурасында вирустың ерекше ЦПД болмауымен дәлелденді.

Вакцинацияның міндеті ағзаның қорғаныш механизмдерін иммуногенезге барынша тарту арқылы кернеулі және ұзақ иммунитет құру болып табылады, бұл көбінесе иммуногенезді – адьюванттарды тандау және қолдануға байланысты. Көптеген вирусты инактивирленген вакциналар әлсіз иммундық реакцияларды туындататындықтан, қосылулары әртүрлі дәрежеде осы жетіспеушілікті өтеуге мүмкіндік берген адьюванттарды пайдалана бастады.

ШРРС қарсы бивалентті инактивацияланған вакцинаның эксперименталды үлгілерін құрастыру үшін ең оңтайлы адьювантты іздеуде біз «Seppic» фирмасының коммерциялық адьюванты (Франция) тандап алды, *MontanideGEL 01 ST* бұл өндіруші шошқаның вирустық ауруларына қарсы инактивацияланған вакциналарды дайындау үшін ұсынған [24].

Инактивирленген моновакцинаның эксперименттік үлгілерінің иммуностимуляциялық (антигендік) тиімділігін майлы адьювантпен бірге кешенде салыстырмалы бағалауды бұрын торайларда олардың температуралық реакциясын, препараттарды енгізуге жергілікті реакцияны және антиденелердің жинақталу деңгейін ескере отырып жүргізген [25].

Иммунитет қалыптастыру кезінде анықтаушы фактор ағзаға енгізілетін антиген дозасы болып табылатыны белгілі. Вакциналардың иммуногендігі, әдетте, егілген дозада антиген концентрациясына тікелей тәуелді болады, яғни

препараттың белсенділігі жоғары болған сайын, оның иммуногендігі неғұрлым елеулі иммуногенділікке ие болады, ол жануарларда егуден кейін қысқа мерзімде және ұзақ мерзімге кернеулі иммунитет тудырады [26].

Montanide Gel 01 адъюванттың негізінде ШРРС қарсы бивалентті инактивирленген вакцинаның бірінші эксперименталды үлгісінің оңтайлы иммунизациялаушы дозасын анықтау кезінде ШРРС-на насеронегативті (мойын аймағына бұлшықет ішіне 21 тәулік аралығымен екі рет 2 мл және 4 мл дозаларда сыналатын препаратты енгізген) жүргізді. Вакцинаны 2,0 мл көлемінде енгізу 4,0 мл дозаға қарағанда иммундық жауаптың төмен деңгейінің қалыптасуын туындатқаны анықталды. Осылайша, жүргізілген зерттеулер негізінде *Montanide Gel 01* адъюванты негізінде бивалентті инактивацияланған вакцинаның оңтайлы иммундау дозасы 4,0 мл құрайтыны анықталды.

Алғашқы эксперименталды үлгімен бивалентті инактивацияланған вакцинамен егілген шошқада иммунитетінің басталу мерзімі мен ұзақтығын анықтау бойынша тәжірибеде 12 иммунизацияланған қорғасындарда антиденелердің қалыптасу динамикасын зерттеді. Егілген инактивирленген бивалентті вакцинада иммунитет 24 тәулікке (21 тәулікке ревакцинациядан кейін) 50%, 36 тәулікке – 100% егілген жануарларда және жануарлардың организмінде антиденелердің тестіленетін деңгейі жоғары деңгейде 56 тәулікке дейін сақталғаны анықталды. Одан әрі зерттеу осы жануарлардың ағзадағы антиденелер деңгейі (120 тәулікке дейін), олардың ұсталу деңгейінің төмендігін көрсетті.

ҚОРЫТЫНДЫ

Жоба бойынша зерттеу жүргізу кезінде вирусты өсіру Бүкілресейлік жануарларды қорғау ғылыми-зерттеу институты қабылданған әдістемесі бойынша жүргізілді. Вирустың індеттік белсенділігін торша өсіндісінде титрлеу әдісімен анықтайды. Толық залалсыздандырылғанын *MARC-145* торша өсіндісінде кезегімен 3 пассаж жасау арқылы анықталды.

Жұмыстың нәтижесі бойынша келесі қорытындылар жасалды:

- ШРРС қарсы инактивирленген вакцинаны дайындау, бақылау және қолдану бойынша нормативтік-техникалық құжаттар бойынша жүргізілді.

- ШРРС вирусы штаммдарының концентрацияланған суспензиясын алу тангенциальды ағында сүзу әдісімен жүргізілді.

- *MARC-145* жасушалар культурасында ШРРС вирусының «Arterivirus/LKZ/2010» және «Kostanay-СМ/08» штамдарының жинақталу деңгейінде айтарлықтай айырмашылық байқалмады.

- Вакцинаның антигендік белсенділігін арттыру үшін вирус штаммдарының инактивацияланған суспензиясының 20 есе концентрациясы қажет.

АНЫҚТАМАЛАР, БЕЛГІЛЕУЛЕР ЖӘНЕ ҚЫСҚАРТУЛАР

ҒЗЖ туралы осы есепте тиісті анықтамалары, белгілері және қысқартулары бар мынадай терминдер қолданылады:

адьювант-антигендерге иммундық жауапты ерекше күшейтетін зат;

БЖҚҒЗИ-Бүкілресейлік жануарларды қорғау ғылыми-зерттеу институты;

ЖДДСҰ-Жануарлардың Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы;

ДЭИ-димерэтиленмин;

вирустың инактивациясы-геномды физикалық және химиялық әсермен зақымдау арқылы вирустың инфекциялық белсенділігін жою;

иммундау дозасы-жануарларда иммундық жауапты қалыптастыру үшін жеткілікті доза;

иммундау - белсенді (вакциналар мен анатоксиндер енгізу кезінде) немесе пассивті (сарысулар немесе гамма – глобулиндер енгізу кезінде) жасанды иммунитетті құру;

ИФТ-иммуноферменттік талдау;

MARC-145-жасушалардың ауыстырып тиелетін дақылы (эмбрионының жасушаларының клондық нұсқасы макаки-резус МА-104);

MontanideISA, IMS, Gel – "Seppic фирмасының" (Франция) майлы адьюванты;

БҚПҒЗИ-биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты;

ҒЗЖ-Ғылыми-зерттеу жұмысы;

ҒӨБ-ғылыми-өндірістік бірлестік;

ПТР-полимеразды тізбекті реакция;

Айналмалы сызық-ағзадан тыс (invitro) көбею қабілетін ұзақ уақыт сақтайтын мәдениеті белгісіз жасушалар;

ШРРС-шошқаның репродуктивті-респираторлық синдромы;

ТЦД₅₀-50 % - дық тіндік цитопатикалық доза;

ІҚМ-ірі-қара мал;

ЦПӨ-цитопатиялық әсер;

ОТ – иммуноферменттік талдау реакциясын есепке алу нәтижесі, яғни субстраттың оптикалық тығыздығының оң бақылауға қатынасы.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Vanhee M., Delputte P., Delrue I. et al. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus neutralizing antibodies // Vet. Res. - 2009. - Vol.40. - P. 63.
- 2 Delrue I., Delputte P., Nauwynck H. Assessing the functionality of viral entry-associated domains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during inactivation procedures, a potential tool to optimize inactivated vaccines // Vet. Res. - 2009. - Vol.40. - P. 62.
- 3 Misinzo G., Delputte P., Meerts P. et al. Efficacy of an inactivated PRRSV vaccine: induction of virus-neutralizing antibodies and partial virological protection upon challenge // Adv. Exp. Med. Biol. - 2006. - Vol.581. - P. 449-454.
- 4 Yordanov S. Application and affectivity of scheme for immunoprophylaxy of Actinobacilluspleuropneumonia /APP/ and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with inactivated vaccines // 5th Int. Symp. on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. - Krakow, Poland. - 2007. - P. 218.
- 5 Байбиков Т.З. и др. Разработка и применение отечественных вакцин для специфической профилактики репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Науч. основы произ-ва вет. биол. препаратов: тез. докл. – Щелково, 2000. - С. 87-89.
- 6 Орлянкин Б.Г. и др. Разработка инактивированной вакцины против репродуктивно - респираторного синдрома свиней // Науч. основы произ-ва вет. биол. препаратов: тез. докл. – Щелково, 2000. - С. 89-91.
- 7 Соколов М.А. Биологические свойства штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 - М., 2004. - 102 с. - Библиогр.: с. 80-102. - 04200419326.
- 8 Соколов М.А. Оценка антигенной активности вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней в производственном опыте // Актуал. пробл. инфекц. патологии жив-х: матер. междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2003. - С. 409-412.
- 9 Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины // М.: - 2007. - 507 с.
- 10 Deville S., Arous J.B., Ionkoff G., Bertrand F., Kukushkin S., Baybikov T., Borisov V., Dupuis L. Load reduction in live PRRS vaccines using oil and polymer adjuvants // Proc. Vaccinol. – 2012. – 6. – P. 134-140.
- 11 Курман И.Я., Байбиков Т.З., Дудникова Н.С. Разработка непрямого иммуноферментного анализа для определения антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней в сыворотках крови свиней // Матер. конф. молод. учен. «Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику». - Владимир, 16-18 ноября 2000 г. - С. 155-161.
- 12 Евсеев А.М. Иммунобиологические свойства вируса чумы мелких жвачных животных: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. – пгт. Гвардейский, 1992.
- 13 Азанбекова М.А., Мамбеталиев М., Ажибаев А.Ж., Табынов К.К., Хусаинов Д.М. Подбор эффективного инактиванта для вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Ветеринария. - 2014. - №2(36). - С. 50-55.

<http://worldgonesour.ru/veterinarnaya-immunologiya/2425-logarifmicheskaya-eksponencialnaya-faza-produkcii-antitel.html>

14 Факторы, влияющие на размножение вирусов. Размножение вирусов в культуре // <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/910.html>

15 Parker R., Deville S., Dupuis L., Bertrand F., Aucouturier J. Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide™ Gel safety profile // Proc. Vaccinol. – 2009. –1. –P. 140-147.



Университет:	Satbayev University
Название:	Ауыл шаруашылық жануарларының репродуктивті және тыныс алу синдромына қарсы вакциналарды өндіру технологиясын жасау
Автор:	Раимбаева Шынар Арманқызы
Координатор:	Гульнара Курбанова
Дата отчета:	2019-04-26 11:00:01
Коэффициент подобию № 1:	4,8%
Коэффициент подобию № 2:	0,7%
Длина фразы для коэффициента подобию № 2:	25
Количество слов:	7 956
Число знаков:	65 642
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок:	3



К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены соответственно.

Количество выделенных слов 10

Самые длинные фрагменты, определенные, как подобные

№	Название, имя автора или адрес гиперссылки (Название базы данных)	Автор	Количество одинаковых слов
1	URL_ https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-323		28
2	URL_ https://revolution.allbest.ru/medicine/00245856_1.html		26
3	URL_ https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-323		22
4	URL_ http://medical-diss.com/veterinariya/razrabotka-sredstv-spetsificheskoy-profilaktiki-reproduktivno-respiratornogo-sindroma-sviney		18
5	Куанышова Наргиза дп.docx Satbayev University (И_П_И)	Куанышова Наргиза	15
6	Өзен мұнай – көп орнындағы мұнаймен ластанған топырақты биологиялық тазалау технологиясын жасау Satbayev University (И_И_В_Т)	Қазыбай Гулмаржан Амангалиқызы	15
7	URL_ https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-323		15
8	URL_ http://medical-diss.com/veterinariya/razrabotka-sredstv-spetsificheskoy-profilaktiki-reproduktivno-respiratornogo-sindroma-sviney		15
9	URL_ http://medical-diss.com/veterinariya/razrabotka-sredstv-spetsificheskoy-profilaktiki-reproduktivno-respiratornogo-sindroma-sviney		14
10	URL_ http://medical-diss.com/veterinariya/razrabotka-sredstv-spetsificheskoy-profilaktiki-reproduktivno-respiratornogo-sindroma-sviney		14

Документы, в которых найдено подобные фрагменты: из

РЕЦЕНЗИЯ

Дипломдық жұмыс

Раимбаева Шынар Арманқызы

5B070100 – «Биотехнология»

Тақырыбы: Ауыл шаруашылық жануарларының репродуктивті және тыныс алу синдромына қарсы вакциналарды өндіру технологиясын жасау

Орындалды:

- а) графикалық бөлім 5 парақ
б) түсініктеме 85 бет

ЖҰМЫСҚА ЕСКЕРТУ

Бітіруші жұмыстың тақырыбы, мазмұны, құрамы, көлемі оқу жоспары мен бағдарламасына сәйкес, арнайы нормативтер – ҚМЖЕ, БМБ, оқулықтар, анықтамалықтарға сай дұрыс шешімдер қабылданып орындалған. Бітіруші жұмыстың бөлімдері - әдеби шолу, зерттеу бөлімдерімен еңбек қорғау бөлімдерінен тұрады.

Дипломдық жұмыста отандық бивалентті инактивацияланған вакцина дайындау технологиясын әзірлеу үшін ШРРС вирусының еуропалық және солтүстікамерикандық генотиптеріне қарсы иммуногендік вакцина дайындау технологиясын іздеу бойынша зерттеулер жүргізілді.

Жалпы бітіруші жұмыста ешбір айтарлықтай қателер жоқ. Қолданылған әдебиеттерге сілтеме көрсетілген. Түсінік жазбасында компьютерлік қателер кездеспейді.

ЖҰМЫСТЫҢ БАҒАСЫ

Бітіруші жұмыс жалпы өте жақсы орындалған, жоғарыдағы көрсетілген кемшіліктер Раимбаева Шынар маман болып шығуына ешқандай кедергісін тигізбейді. Раимбаева Шынар бітіруші жұмысын жақсы қорғаған жағдайда «өте жақсы» деген бағаға ұсынамын.



Сакиева Зауре Жандарбековна

«02» 06 2019 ж.