

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
КЫРГЫЗСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени К.И. СКРЯБИНА  
КЫРГЫЗСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ВЕТЕРИНАРИИ имени АРСТАНБЕКА ДУЙШЕЕВА**

**Диссертационный совет Д.16.09.397**

На правах рукописи  
УДК 619:578.821.21

**ДЖАПАРАЛИЕВ НУРЛАН ТЫНЧТЫКБЕКОВИЧ**

**РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ  
И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ И КОЗ**

06.02.02 - ветеринарная микробиология,  
вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат диссертации**

**на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**БИШКЕК - 2011**

Диссертационная работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А.Дуйшеева, на базе закрытого акционерного общества «Алтын-Тамыр» и неблагополучных по оспе овец и коз хозяйств республики.

**Научный консультант:** доктор ветеринарных наук, член-корреспондент Национальной Академии Наук Кыргызской Республики, профессор  
**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович**

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор  
**Усманов Рафик Каримович**  
доктор биологических наук, профессор  
**Соколова Надежда Львовна**  
доктор биологических наук, профессор  
**Толысбаев Божбан Толысбаевич**

**Ведущая организация:** научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК (пгт. Гвардейский, Республика Казахстан)

Защита диссертации состоится “ 27 ” мая 2011 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании межведомственного диссертационного совета Д.16.09.397 при Кыргызском национальном аграрном университете им. К.И.Скрябина (соучредитель Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии им.А.Дуйшеева) по адресу: 720005, г.Бишкек, ул.О.Медерова, 68

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им.К.И.Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2011 г.

**Ученый секретарь межведомственного диссертационного совета,**  
доктор ветеринарных наук, профессор

**Акназаров Б.К.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Оспа овец и коз является особо опасным инфекционным заболеванием, способным вызывать эпизоотии и наносить огромный экономический ущерб животноводству. Эпизоотическая ситуация в мире по оспе овец и коз в последние годы остается напряженной. По данным МЭБ в течение 2000-2008 г.г. неблагополучными по этому заболеванию были 57 стран мира, в том числе 30 африканских, 24 азиатских и 3 европейских. Кыргызская Республика до 2002 года была благополучной по оспе овец. Возникновение очагов оспы в 2002 году в Таласской области было связано с ухудшением эпизоотической обстановки по оспе в Афганистане и Таджикистане (Animal disease data of OIE, 2008).

Основополагающую роль в борьбе с оспой животных играет своевременная диагностика и меры специфической профилактики. Для профилактики оспы овец и коз применяют вакцины из аттенуированных штаммов вируса оспы. При выборе вакцины, предназначенной для массовой иммунизации, особое внимание обращают на безопасность и длительность иммунитета у животных после применения вакцины (R.P. Kitching, 1986; I. Yeruham и др., 2007). Для получения безопасных вирусвакцин используют различные системы культивирования вируса и подбирают оптимальные условия.

Однако многие вопросы, связанные с культивированием вируса оспы, еще недостаточно изучены. Для получения вируса использовались различные системы, большинство из которых оказались непригодными, что было связано с низкой репродукцией или утратой иммуногенных свойств вируса. Получение вируса с высоким титром на культуре клеток почек ягненка (ПЯ) и почек козленка (ПК) возможно при оптимизации условий культивирования, которые позволяют сохранять его исходные биологические свойства. Решение этой проблемы является актуальной задачей.

Одним из важных моментов в борьбе с оспой животных является быстрая и точная диагностика возникшего заболевания и как следствие, оперативные мероприятия, направленные на купирование и ликвидацию очага инфекции (R.P. Kitching, 2008).

В настоящее время наряду с определением заболевания по клиническим признакам используются такие серологические методы диагностики оспы, как реакция связывания комплемента (РСК), реакция диффузионной преципитации (РДП), реакция нейтрализации (РН), метод флуоресцирующих антител (МФА), метод встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) с использованием специфических сывороток и антигенов, разработанных для каждой реакции. Каждый метод

наряду с положительными качествами, имеет и отрицательные стороны в плане их экспрессности, чувствительности, технической сложности постановки.

Современные методы (на основе иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции) имеют ряд принципиальных особенностей по сравнению с традиционно существующими. Основными достоинствами новых методов также являются высокая чувствительность, производительность и несложная техника постановки.

Разработка диагностикумов при оспе овец и коз и определение иммунного статуса организма животных в отношении оспы обосновываются тем, что в современных условиях, когда отмечается благополучие страны по оспе, занос инфекции не исключается. Поэтому своевременная диагностика и расшифровка этиологии каждого единичного случая приобретают особую значимость и актуальность. При этом необходимы быстрые методы выделения и идентификации вируса, проведение анализа на наличие специфических антител в сыворотке крови животных.

***Связь темы диссертации с основными научными программами и основными научно-исследовательскими работами.*** Научно-исследовательская работа по данной проблеме выполнялась в соответствии с тематическим планом отдела вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева по теме: «Разработка и усовершенствование биотехнологии биологических препаратов» (номер госрегистрации – 0004025).

***Цели и задачи исследования.*** Целью нашей работы являлись разработка и совершенствование технологии изготовления средств диагностики и специфической профилактики оспы овец и коз.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- провести анализ эпизоотической ситуации по оспе животных за последние годы;
- выделить от больных оспой животных изоляты вируса и изучить их иммунобиологические свойства для изготовления биологических препаратов;
- оптимизировать условия культивирования вакцинного штамма SP вируса оспы овец;
- оптимизировать условия культивирования вакцинного штамма ГК вируса оспы коз;
- усовершенствовать методы получения диагностических препаратов для идентификации вируса оспы овец и коз и выявления антител к вирусам в сыворотке крови;

-разработать иммуноферментные тест-системы для выделения вирусов оспы овец и коз в сыворотке крови и в биологическом материале;

-разработать ПЦР тест-систему для выявления специфических фрагментов генома вирусов оспы овец и коз в биологическом материале;

-изготовить единый антиген для диагностики оспы овец и коз методами: иммуноферментного анализа, реакцией длительного связывания комплемента и диффузионной преципитации;

-изготовить из местного штамма вируса оспы овец вакцину и изучить ее иммунобиологические свойства;

-изготовить из местного штамма вируса оспы коз вакцину и изучить ее иммунобиологические свойства;

**Научная новизна.** Впервые в Кыргызской Республике получен местный штамм SP вируса оспы овец и штамм ГК вируса оспы коз. Изучены их иммунобиологические свойства, которые отличаются от вакцинных и ранее выделенных изолятов в Кыргызской Республике.

Разработана тест-система ИФА для выявления вируса оспы овец в биологическом материале на основе сэндвич-варианта и непрямого варианта для выявления вирусспецифических антител в сыворотках крови овец и коз.

Впервые в Кыргызской Республике разработана тест-система на основе полимеразной цепной реакции для выявления вирусспецифических фрагментов оспы овец и коз в биологических материалах.

Изготовлены культуральные вирусвакцины против оспы овец и коз из штаммов SP и ГК. Научная новизна их подтверждена патентами выданные государственной патентной службой Кыргызской Республики №1193 и №1226 от 30 сентября 2009 года.

**Практическая значимость работы.** Выделенные и адаптированные штаммы SP и ГК вирусов оспы овец и коз используются в конструировании биологических препаратов (вакцин, диагностикумов). Изготовлены вирусвакцины сухие культуральные против оспы коз из штамма ГК и против оспы овец из штамма SP на основе ТУ и НТД (КМС 1046: 2007 и 1047: 2007), соответствующие требованиям МЭБ.

Разработаны "Методические указания по выявлению и идентификации вируса оспы овец в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа". Разработаны "Методика по выявлению антител к вирусу оспы в сыворотке крови овец в непрямом варианте иммуноферментного анализа" и "Методика по выявлению генома вируса оспы овец и коз с помощью полимеразной цепной реакции". Вакцины и диагностикумы успешно прошли производственные испытания и применяются в ветеринарной практике.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Внедрение в ветеринарную практику рекомендуемых вакцин из местных штаммов для профилактики оспы овец и коз значительно сократит заболеваемость и падеж животных. При этом снизится расход средств на проведение организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий. Стоимость вакцин составляет 1 сом за дозу, что в 2-3 раза дешевле импортируемых.

Применение разработанных тест-систем на основе ИФА и ПЦР позволит в ранние сроки поставить диагноз, купировать оспу овец и коз и предотвратить их дальнейшее распространение.

**Личный вклад соискателя.** Соискателем самостоятельно проведен эпизоотологический мониторинг оспы овец и коз в Кыргызской Республике. Изучены иммунобиологические свойства вакцин на овцах и козах. Проведен анализ и обобщение экспериментальных данных. Научный анализ полученных данных выполнен непосредственно соискателем.

**Апробация результатов диссертации.** Результаты исследований по теме диссертации доложены на международных научно-практических конференциях: Кыргызского аграрного университета им. К.И. Скрябина и Кыргызского научно-исследовательского института им. А. Дуйшеева (Бишкек, 2004-2009), Казахского научно-исследовательского ветеринарного института (Алматы, 2007-2009), Казахского агротехнического университета им. С. Сейфулина (2009-2010), 50-летию научно-исследовательского института проблем биологической безопасности НЦБ МОН РК (Алматы, 2008), «Высшее образование и аграрная наука – сельскому хозяйству» (Семипалатинск, 2009).

**Публикация результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 34 научных работ, 1 монография и получены 2 патента.

**Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:**

1. Эпизоотический анализ ситуации в Кыргызской Республике по оспе овец за 2002-2010 годы.
2. Условия культивирования вакцинного вируса оспы овец в первично-трипсинизированной культуре клеток ПЯ.
3. Условия культивирования вакцинного вируса оспы коз в первично-трипсинизированной культуре клеток ПК.
4. Тест-системы, разработанные на основе сэндвич-варианта ИФА для выявления и оценки титра антигена вируса оспы овец и коз в биологическом материале.

5. Тест-системы, разработанные на основе непрямого варианта ИФА для выявления и оценки титров вирусспецифических антител в сыворотках крови овец и коз.

6. Тест-системы, разработанные на основе полимеразной цепной реакции для выявления специфических фрагментов вирусов оспы овец и коз в биологическом материале.

7. Изготовление вирусвакцины против оспы овец из штамма SP и изучение ее иммунобиологических свойств: динамика накопления ВНА в крови вакцинированных овец, сопоставление результатов серологических исследований и показателей защищенности вакцинированных овец, активность вакцины в процессе хранения.

8. Изготовление вирусвакцины против оспы коз из штамма ГК и изучение ее иммунобиологических свойств: динамика накопления ВНА в крови вакцинированных коз, сопоставление результатов серологических исследований и показателей защищенности вакцинированных коз, активность вакцины в процессе хранения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 200 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических предложений. Содержит 44 таблицы и 12 рисунков. Список использованной литературы включает 221 наименование, из них 146 авторов дальнего зарубежья. В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы исследований, приводится общая характеристика вирусов оспы овец и коз, современная диагностика и меры специфической профилактики заболевания, культивирования вирусов и разработки методов диагностики.

**В главе 1 «Обзор литературы»** по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается общая характеристика оспы овец и коз включающая историю открытия вирусов, способы передачи и распространения заболеваний, клиническая и патологоанатомическая картина. Приводятся эпизоотологические данные по распространению оспы овец и коз в мире и Кыргызской Республике, частота вспышек, анализ последних вспышек в нашей стране, а также слагаемые ущерба и их оценка. Дается таксономия оспы овец и коз, строение вирусов, их

устойчивость к факторам внешней среды, организация генома и репликация вирусов.

Приводятся данные по разработанным методам рутинной и молекулярно-биологической диагностики, а также характеристика различных видов вакцин для иммунизации овец и коз.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** дана характеристика объектов исследований и методический подход к выполнению исследований.

Для проведения исследований были использованы штаммы и ДНК различных вирусов, патологические материалы, образцы крови, сывороток крови овец и коз, суспензии органов.

Основные вирусологические исследования выполнены на первично-трипсинизированной культуре клеток почек ягненка (ПЯ), почек козленка (ПК), тестикул ягненка (ТЯ) и тестикул козленка (ТК).

Ростовая питательная среда Игла или 199, используемая для выращивания первично-трипсинизированных почек овец и коз, состоящая из 0,5% гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса, 10%-ной нормальной сыворотки КРС, пенициллина 100 000 и нистатина 25 000 ЕД, стрептомицина 0,1 г на 1 л среды, рН 7,0 - 7,2.

Инфекционный титр вируса оспы овец и коз определяли в культурах клеток ПЯ и ПК, выращенной в виде монослоя в пенициллиновых флаконах.

Для определения титра вируснейтрализующих антител в сыворотке крови использовали постоянную дозу вируса против ряда последовательных двукратных разведений сыворотки.

Оценку титра антител к вирусу оспы и титра соответствующего антигена проводили согласно "Временной инструкции по изготовлению и контролю комплексного культурального антигена для РДСК и РДП при оспе овец".

Для определения титра вируснейтрализующих антител использовали реакцию нейтрализации (РН). Постановку РН осуществляли на культурах клеток ПЯ или ПК по общепринятой методике с двукратным разведением исследуемых сывороток и постоянной дозой вируса штамма «Афганский».

В полученное вируссодержащее сырье вносили необходимое количество защитной среды и тщательно перемешивали. Затем вакцину расфасовали по  $4 \pm 0.06$  мл во флаконы вместимостью 10 мл и подвергали лиофилизации на установках Frigera (Чехия) и Usifroid (Франция).

Геномную ДНК выделяли из инфицированных вирусом чувствительных культур клеток (ПЯ и ПК). Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Mini Cyclor РТС-100 и Терцик.

Смесь готовили непосредственно перед амплификацией, добавляли ДНК, нагревали 5 мин при 95°C, охлаждали и вносили Таq-полимеразу. В каждую пробирку насливали по 20 мкл минерального масла и проводили амплификацию. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 2,5%-ном агарозном геле и буферном растворе, содержащем 89 мМ триса, рН 8,0; 89 мМ борной кислоты; 2,5 мМ ЭДТА; 0,5мкг/мл бромистого этидия. Характеристики праймеров для ПЦР приведены в таблице 1.

Таблица 1

### Праймеры для ПЦР

Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5' - 3'	Положение в геноме*
KS-1	GTGTGACTTTCCTGCCGAAT	1249-1268
KS-2	TCTATTTTATTTTCGTATATC	1398-1417

При анализе и обобщении результатов исследований нами использовались методы, описанные в руководстве по биометрии.

Использовали общепринятые методы оценки дисперсии, стандартного отклонения и доверительного интервала варьирующих переменных, устанавливали количественные показатели связи зависимых переменных в виде коэффициентов корреляции или коэффициентов регрессионных уравнений (И.П. Ашмарин, 1962; В.П. Еременко, 1985).

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Анализ эпизоотической ситуации по оспе овец и коз

Территория Кыргызской Республики до 2002 года являлась свободной от оспы овец. Наша страна имеет общие границы с Таджикистаном и Китаем, неблагополучных по данному заболеванию. Эти страны имеют границы с Ираном, Пакистаном и Афганистаном. В соответствующих приграничных областях республики (Баткенская, Ошская и Жалабатская) государственными ветеринарными службами ежегодно выполнялась программа систематической иммунизации против оспы овец, что обеспечивало устойчивое благополучие этих территорий. Распад СССР привел к отсутствию общей стратегии специфической профилактики оспы овец, что способствовало возникновению и распространению заболевания в странах СНГ, в том числе и в Кыргызской Республике.

Первые крупные вспышки оспы овец были зарегистрированы в 2002 году в хозяйствах Таласской области, что было связано с ухудшением эпизоотической обстановки в Средней Азии. Нарынская область является

неблагополучной с 2007 г., с появлением первых очагов заболевания в Жумгалском районе. В 2008 г. очаги оспы овец регистрировали в Жумгалском, Кочкорском и Нарынском районах республики. На начало 2010 года очаги оспы регистрировались в Атбашинском районе Нарынской области и Тонском районе Иссыкульской области.

Оспа коз в Кыргызской Республике не регистрировалась. Однако данная болезнь регистрируется в соседних районах Таджикистана и в Афганистане. Вакцинация в угрожаемых зонах восприимчивого поголовья ограничивает занос инфекции в нашу страну. В связи с угрозой заноса оспы коз в нашу страну существует объективная необходимость в создании высокоэффективной вакцины против оспы коз.

**Выделение вируса.** Выделение вируса оспы овец из патологического материала, полученного с кожного покрова от больных овец проведено во время вспышки в Таласской области. Вирус оспы коз выделили из патологического материала, любезно предоставленного таджикскими коллегами, отобранного от больных коз во время вспышки на границе с Афганистаном.

**Культивирование вирусов оспы овец и коз.** Целью данного этапа исследований являлось определение оптимальных условий культивирования вакцинных штаммов SP и ГК вирусов оспы овец и коз. Изучали влияние сроков культивирования штаммов на уровень накопления вируса в культуральной суспензии и в инфицированных клетках. Учитывали площадь распространения цитопатического действия вируса на монослое.

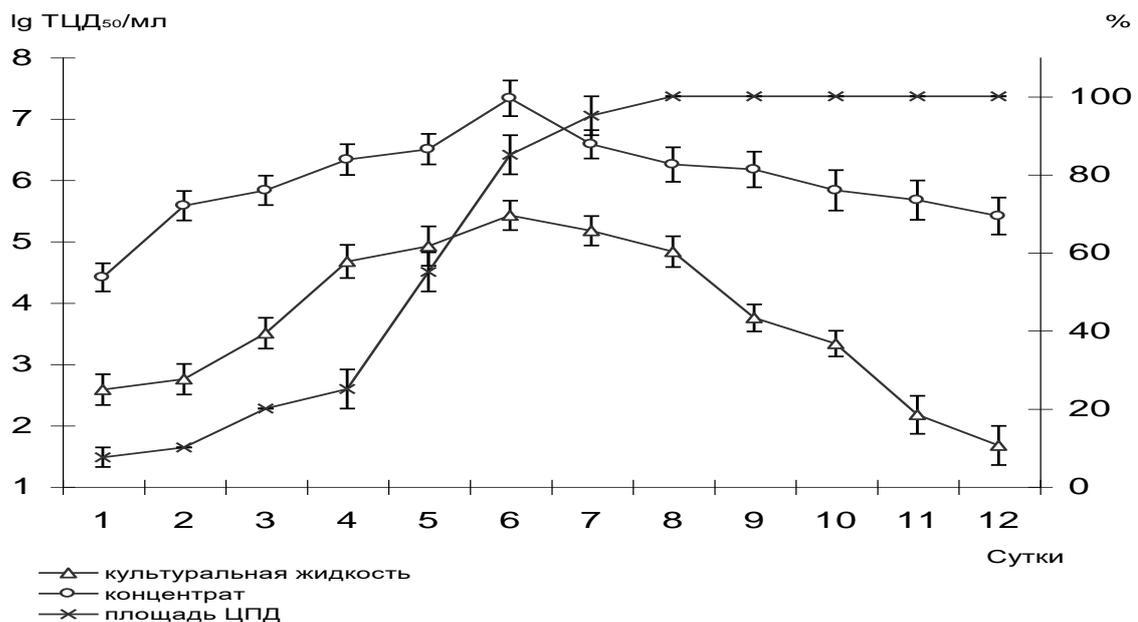
В наших исследованиях для получения вирусосодержащей суспензии использовали 4-5 - суточные первично-перевиваемые клетки ПЯ или ПК. Для заражения использовали вирусосодержащую суспензию с инфекционным титром от 5,5 до 6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Вирусы разводили питательной средой Игла или 199 и вносили в матрас из расчета 0,1 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Затем матрасы помещали в термостат при 37±0,5°С на 1 час на контакт, после этого вносили поддерживающую питательную среду Игла или 199 с 2%-ной инактивированной сывороткой крови крупного рогатого скота в объеме 200 мл и инкубировали при температуре 37±0,5°С. Контролями служили 3 матраса с неинфицированной культурой клеток. Цитопатическое действие вируса выражалось в характерном изменении морфологии клеток.

Рисунок 1 иллюстрирует, что цитопатическое действие вируса можно условно разделить на 2 фазы. Первая фаза имела ограниченное распространение цитопатического эффекта, который, как правило, охватывал от 10 до 30 % площади монослоя. Продолжительность фазы составляла от 2 до 4 суток от начала культивирования.

Вторая фаза характеризовалась более активным действием вируса в клетках, ЦПД при этом наблюдали на площади монослоя от 50 до 100%. Эта фаза продолжалась от 4 до 8 суток. При культивировании вируса более 8 суток происходило полное разрушение монослоя с отслоением клеток от стекла.

Наращение титра вируса в культуральной жидкости в течение первых 7 суток происходило постепенно. Максимальный средний титр составил  $5,42 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . Дальнейшее увеличение сроков культивирования не привело к повышению титра вируса. После 8 суток происходило его снижение, который на 12 сутки составил  $1,67 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

Динамика накопления вируса в концентрате была подобна таковой в культуральной жидкости. Максимальный средний титр достигал значения  $7,33 \pm 0,29 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  на 6-е сутки, после чего происходило его снижение до  $5,41 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  на 12-й день. Все экспериментальные оценки инфекционного титра вируса как в культуральной жидкости, так и в концентрате были хорошо воспроизводимы и имели коэффициент вариации от 3 до 8%.



**Рис.1. Распределение значений титров ( $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ) в культуральной жидкости и концентрате и процентного распространения ЦПД на площади монослоя соответственно времени культивирования вируса.**

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлена возможность выращивания вакцинных штаммов SP и ГК вирусов оспы овец и коз при заражении монослоя культур клеток ПЯ и ПК. Определены оптимальные сроки получения вирусосодержащего материала. Полученные результаты позволили сделать ряд предварительных

заклучений, имеющих возможное отношение к технологии производства профилактических и диагностических препаратов. Максимальное накопление вируса в обоих видах вирусосодержащего материала происходило на 5-7 сутки. Очевидно, что этот период культивирования являлся оптимальным. При этом ЦПД составляло от 70 до 90% площади инфицированного монослоя.

### **3.2. Испытание различных стабилизирующих сред для сухих вирусвакцин против оспы овец и коз**

Для сухих вирусвакцин важное значение имеет подбор оптимальных стабилизирующих сред. В связи с этим в специальных опытах нами в качестве стабилизаторов при лиофильной сушке были испытаны стандартный стабилизирующий раствор, содержащий 5% гидролизата лактальбумина, 5% сахарозы и 1% желатозы, лактозу из расчета 5 мг на 1 мл, стабилизатор югославский фирмы "Pliva" 15% (0,15 мл на 1 мл) и тригалоу - 5 и 15 мг на 1 мл, которые вносили в вирусосодержащую суспензию. Затем образцы вакцины с различными стабилизаторами расфасовывали по  $4 \pm 0.06$  мл во флаконы емкостью 10 мл и подвергали лиофилизации.

В результате проведенных исследований установлено, что наилучший результат получен при добавлении в качестве стабилизатора тригалоу в соотношении 15 мг на 1 мл, когда титр вируса до и после сушки оставался одинаковым и соответствовал  $7,00 \pm 0,27$  -  $7,00 \pm 0,24$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл для оспы коз и  $6,75 \pm 0,16$  -  $6,75 \pm 0,21$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл для оспы овец.

### **3.3. Получение серии вакцинного и контрольного вируса и определение его инфекционной активности**

Для получения серии вирулентных «Афганских» вирусов оспы овец и коз использовали первично перевиваемые культуры клеток ПЯ и ПК и заражали культуру в клинских матрасах емкостью 1,5 л вирусом из расчета 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку. Культуру клеток ставили на контакт 1 час при температуре 37°C, затем заливали поддерживающую среду Игла или 199 с 1-2%-ной сывороткой крупного рогатого скота. Выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 48-72 часов, просматривали под микроскопом. Вирус снимали через 72 часа после появления специфической дегенерации клеток. Матрасы с монослоем клеток промораживали при температуре 40°C. На следующие сутки содержимое замороженных матрасов оттаивали при комнатной температуре, фасовали во флаконы и делали высеv на баксреды (МПБ, МПА, МППБ и Сабуро) на стерильность. Флаконы с вирусосодержащей суспензией при необходимости хранили при температуре -40°C.

В контрольных опытах использовали по 24 кролика массой до 2 кг на каждый контрольный штамм. Для титрования использовали 3 ампулы высушенного контрольного вируса по 1,0 мл и готовили разведения от  $10^{-4}$  до  $10^{-9}$  на питательной среде Хенкса. Каждое разведение вируса вводили четверем кроликам подкожно в область наружной стороны бедра в дозе 1мл. За животными вели клиническое наблюдение в течение 15 дней. Активность вируса определяли по гибели кроликов и наличию характерных расчесов на месте введения вируса.

Установлено, что инфекционная активность контрольного вируса оспы коз штамма "Афганский" для кроликов составила  $10^{7,0}$  ЛКД<sub>50</sub>/мл, а для оспы овец  $10^{6,5}$  ЛКД<sub>50</sub>/мл.

#### **3.4. Получение и контроль вакцин против оспы овец и коз из штаммов SP и ГК**

Вакцинные штаммы оспы овец и коз SP и ГК сохраняли при температуре минус 40°C в лиофилизированном виде. Периодически (рекомендуется через каждые 3 года) штамм "освежали" в культуре клеток ПЯ или ПК, в зависимости от освежаемого штамма с последующей лиофилизацией.

Стерильный вирусодержащий материал использовали для приготовления очередных серий вакцин при наличии титра вируса не ниже  $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . С этой целью содержимое стерильных матрасов сливали в один сосуд и добавляли охлажденный до  $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  стандартный стабилизирующий раствор. Содержимое сосуда тщательно перемешивали, разливали в стерильные ампулы по 1,0 мл, накрывали стерильной марлевой салфеткой (4 слоя) и в металлических кассетах переносили в предварительно охлажденную камеру вакуумной сублимационной установки. После высушивания ампулы запаивали при вакууме 25-30 Па. Препарат в ампулах до заключения о его качестве сохраняли при температуре  $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Специфичность вакцинного штамма проверяли в ИФА и ПЦР на основе выявления и идентификации вирусов оспы овец или коз.

**Технологический процесс изготовления вакцины против оспы овец и коз из штаммов SP и ГК** состоит из 2-х этапов: получение матриксной серии вируса и изготовление производственной серии вирусвакцин.

Матриксную серию вирусов оспы овец и коз готовили в различных объемах, в зависимости от потребностей производства.

Для получения вирусодержащих суспензий использовали первично-трипсинизированные культуры клеток ПЯ и ПК с хорошо сформировавшимся монослоем 4-5-суточного возраста, выращенную в 5-10

клинских матрасах. Для этого брали 10-12 ампул лиофилизированных вирусов оспы овец и коз, разбавляли поддерживающей средой в соотношении 1:10. Суспензию вируса вносили по 10 мл в каждый матрас, из которого предварительно сливали ростовую питательную среду, и промывали поддерживающей питательной средой для отмывания монослоя от остатков ростовой среды.

Производственные серии вакцинного вируса готовили из лиофилизированных вирусов оспы овец и коз матриксной серии. Вирусодержащие суспензии получали аналогично суспензии матриксной серии. Полученные вирусодержащие суспензии проверяли на стерильность, биологическую активность, тщательно перемешивали и расфасовывали во флаконы емкостью 500 мл по 200 мл в каждый флакон, замораживали при минус  $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  и хранили при этой температуре не более 1 года, используя для получения производственной серии вирусвакцины.

**Определение стерильности вакцины.** Для определения стерильности пяти серий вакцин брали по десять флаконов лиофильно высушенных вирусвакцин против оспы овец и коз из штаммов SP и ГК. Растворяли путем добавления в каждый флакон по 2 мл стерильного физраствора. Содержимое флаконов объединяли и среднюю пробу использовали для посева на известные питательные среды. Каждый образец средней пробы проверялся в трехкратной повторности.

Испытания показали, что ни в одной из использованных питательных сред не отмечено роста микрофлоры, т.е. все образцы вирусвакцины не были контаминированы бактериальной и грибковой микрофлорой.

**Биологическую активность штаммов** вирусов оспы овец и коз в пяти сериях вакцин определяли методом титрования в культурах клеток ПЯ и ПК. Суспензию каждого разведения вируса, начиная с наибольшего, вносили в 4 пробирки с культурой клеток, по 1 мл. В качестве контроля брали 4 пробирки с культурой клеток, в которые вносили поддерживающую среду без вируса. Зараженные и контрольные пробирки с культурой клеток инкубировали в стационарном положении при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Из представленных данных таблиц 2 и 3 видно, что средняя биологическая активность пяти серий вирусвакцины против оспы коз составила  $6,95\pm 0,45 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{мл}$ , а биологическая активность пяти серий вирусвакцины против оспы овец  $6,71\pm 0,23 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{мл}$ , соответственно.

Таблица 2

**Биологическая активность пяти серий вирусвакцины против оспы коз  
из штамма ГК в культуре клеток ПК**

№ серии вакцины	Титр вируса (Ig ТЦД <sub>50</sub> /мл)
1	6,83±0,11
2	6,66±0,33
3	6,6±0,46
4	7,66±0,17
5	7,0±0,09
Среднее значение	6,95±0,45

Таблица 3

**Биологическая активность пяти серий вирусвакцины против оспы  
овец из штамма SP в культуре клеток ПК**

№ серии вакцины	Титр вируса (Ig ТЦД <sub>50</sub> /мл)
1	6,75±0,19
2	6,66±0,21
3	6,75±0,26
4	6,75±0,19
5	6,66±0,23
Среднее значение	6,71±0,23

При определении безвредности пяти серий вирусвакцин брали 5 флаконов вакцины из каждой серии и разводили стерильным физиологическим раствором. Из полученной суспензии готовили разведение 1:25. Разведенную вакцину вводили 4 овцам и козам по 10 мл подкожно в области внутренней стороны бедра каждому животному, что составляло не менее 10 прививных доз (Табл. 4 и 5).

Таблица 4

**Испытание безвредности пяти серий вирусвакцины против оспы коз  
из штамма ГК на лабораторных животных и козах**

№№ образцов вакцины	Титр вируса	Вид животных	Кол-во животных	Результаты наблюдения	
				местная реакция	гипертермия

1	6,83	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		козы	4	нет	-
2	6,66	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		козы	4	нет	-
3	6,64	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		козы	4	нет	-
4	7,66	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	-
		козы	4	нет	-
5	7,0	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	-
		козы	4	нет	-

Примечание: \* козы привиты вакциной в объеме 10 мл; н.и. - не исследовали; + повышение температуры тела; - температура тела в пределах физиологической нормы.

За животными вели клиническое наблюдение в течение 15 дней, наблюдали за местной реакцией в месте инокуляции вакцины и общую, с измерением температуры тела ежедневно утром и вечером. Из таблиц 3 и 4 видно, что общее физиологическое состояние животных было в пределах нормы и наблюдалось незначительное повышение температуры тела

Вакцины являлись безвредными, так как не вызывали заболеваний и гибели овец и коз в течение 14 суток.

Таким образом, экспериментальные серии вакцин из штаммов SP и ГК стерильны в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры, не обладают реактогенностью и безвредны для лабораторных животных, а также для овец и коз.

Таблица 5

**Испытание безвредности пяти серий вирусвакцины против оспы овец  
из штамма SP на овцах**

№№	Титр	Вид	Кол-во	Результаты наблюдения
----	------	-----	--------	-----------------------

образцов вакцины	вируса	животных	животных	местная реакция	гипертермия
1	6,75	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		овцы	4	нет	-
2	6,66	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		овцы	4	нет	-
3	6,66	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	+
		овцы	4	нет	-
4	6,75	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	-
		овцы	4	нет	-
5	6,66	белые мыши	6	нет	н.и.
		кролики	4	нет	-
		овцы	4	нет	-

### 3.5. Изучение иммуногенных свойств вирусвакцин против оспы овец и коз из штаммов SP и ГК

Вакцину овцам вводили подкожно в бесшерстный участок подмышечной области в разведении 1:25, 1:50, 1:100 по 1 см<sup>3</sup>. Через 12 дней после вакцинации указанных животных с 3-мя ревакцинированными (контрольными) заражали внутрикожно вирулентным штаммом вируса оспы в дозе 500-1000 ИД<sub>50</sub> по 0,5 см<sup>3</sup> во внутреннюю поверхность хвоста. У зараженных овец ежедневно измеряли температуру тела и проводили клинический осмотр в течение 14 дней.

Средние титры антител через 6 дней после вакцинации были  $1,6 \pm 0,71$  лог<sub>2</sub>, через 9 дней -  $2,12 \pm 0,88$  лог<sub>2</sub>, на 12 и 14 день -  $3,35 \pm 0,57$  и  $3,39 \pm 0,68$  лог<sub>2</sub>, соответственно (Табл. 6).

Результаты опытов показали, что вирусвакцина против оспы овец из штамма SP, культуральная сухая с биологической активностью в культуре клеток  $10^{6,75}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл обладает иммуногенной активностью.

Таблица 6

#### Иммуногенная активности вирусвакцины против оспы овец на овцах

№№ живот -ных		Титры антител (в лог <sub>2</sub> )				Результат заражения
		6 день.	9 день	12 день	14 день средний	
1	Вакцини- рованные	1,5	1,35	3,0	3,39±0,68	6/0
2		1,66	1,0	3,5		
3		1,0	3,5	4,0		
4		2,0	2,17	2,83		
5		1,5	1,0	3,76		
6		1,0	1,5	3,23		
7	Контроль					2/2
8						
9						

Примечание: числитель – количество животных в опыте  
знаменатель – количество заболевших животных

### **Изучение эффективности вирусвакцины из штамма SP против оспы овец на овцах различного возраста в эпизоотических условиях.**

Основными факторами сдерживания эпизоотического процесса является комплекс карантинных мероприятий и специфическая профилактика оспы среди восприимчивого овцепоголовья. Уменьшение числа заболевших оспой овец в Кыргызской Республике к 2009 году связано с массовой иммунизацией животных. Например, в хозяйствах Атбашинского района Нарынской области стабилизация эпизоотической ситуации была достигнута после применения вирусвакцины против оспы овец из штамма SP.

Проведен анализ эффективности однократной иммунизации овец различного возраста указанной вакциной в частных хозяйствах Нарынской области. Для этого вакцинации подвергали 1500 взрослых овец и 500 голов молодняка 4-5-ти месячного возраста. Вакцинация проводилась практическими ветеринарными работниками хозяйства.

Результаты вакцинации приведены в таблице 7. Процент незаболевших овец составил 99,67%. Только в двух отарах заболело оспой 5 овец.

Таблица 7

### **Устойчивость овец к оспе после однократной иммунизации вакциной из штамма SP в хозяйствах Атбашинского района**

№№ групп	Характеристика животных	Количество овец	Заболело	
			голов	процент
1	Овцематки	1500	5	0,33
2	Молодняк 4-5 месяцев	500	12	2,4
3	Овцы разного возраста невакцинированные	2045	1980	96,82

Общий процент защищенных животных составил 97,6%.

Непривитые овцы, как правило, болели оспой в генерализованной форме. Так, в двух отарах, насчитывающих 2045 голов и не подвергавшихся иммунизации, 96,82% животных заболели с проявлением тяжелых клинических признаков.

В опытной группе несмотря на заболевание отдельных овец оспой, процент защиты от инфекции был высоким, что свидетельствует о достаточной эффективности вакцины против оспы овец из штамма SP.

**Изучение иммуногенности вирусвакцины против оспы коз из штамма ГК на козах.** Иммуногенную активность вакцины проверяли на 7 козах аборигенной породы 2-3-летнего возраста, из которых 5 голов подвергались иммунизации, а два животных служили контролем. Для иммунизации содержимое 5 флаконов, содержащих лиофильно высушенную вакцину с биологической активностью в культуре клеток ПК равную  $10^{6,66}$ ТЦД<sub>50</sub>/мл, разводили до исходного объема стерильным физиологическим раствором, объединяли, тщательно перемешивали. Из полученной пробы готовили разведение 1:25. Разведенную вакцину вводили животным по 1 мл подкожно в подмышечную область.

Через 14 дней всех вакцинированных и двух контрольных животных заражали подкожно в области внутренней поверхности бедра вирулентным вирусом оспы коз штамма "Афганский" в дозе  $10^3$  ИД<sub>50</sub> в объеме 1 мл. Перед вакцинацией и контрольным заражением у всех животных отбирали пробы крови для получения сыворотки, которую исследовали на наличие антител к вирусу оспы коз в РН и ИФА.

Результаты исследований сывороток крови представлены в таблице 8, из которой видно, что уровень антител в крови вакцинированных животных в РН был от 4,66 до 6,0 лог<sub>2</sub>, средний -  $5,35 \pm 0,56$  лог<sub>2</sub>, а в ИФА - 1:4 - 1:64.

Таким образом можно заключить, что вирусвакцина против оспы коз из штамма ГК безвредна, нереактогенна, обладает высокими иммуногенными свойствами, стимулирует образование достаточно высокого уровня специфических антител и защищает всех

вакцинированных животных от заболевания при контрольном заражении вирулентным вирусом.

Таблица 8

**Титры антител против оспы коз в крови привитых коз и устойчивость их к заболеванию при контрольном заражении вирулентным вирусом**

№№ жив-ных	Характеристика	Титры антител					Результат заражения
		до вакцинации		через 14 дней после вакцинации			
		РН	ИФА	РН		ИФА	
				индивид.	средний		
1	Вакцинированные	—	—	5,24	5,35±0,56	1:16-64	5/0
2		—	—	5,83		1:16-64	
3		—	—	6,0		1:16	
4		—	—	5,0		1:64	
5		—	—	4,66		1:4	
6	Контроль	—	—	—		—	2/2
7		—	—	—		—	

Примечание: в числителе – количество животных в опыте;  
в знаменателе – количество заболевших животных;  
– антител не обнаружено.

**Динамика накопления антител в крови овец, вакцинированных против оспы.** В опытах использовали 10 кыргызских грубошерстных овец 2-3 летнего возраста, из которых 7 были иммунизированы, а 3 невакцинированных служили контролем. Вакцину против оспы овец из штамма SP вводили согласно наставлению.

Через 14 дней всех вакцинированных и 3-х контрольных овец заражали вирулентным вирусом оспы овец штаммой "Афганский" путем введения суспензии внутрикожно в область внутренней стороны хвоста по 500 ИД<sub>50</sub>/0,5мл.

Результаты исследований сывороток, приведенные в таблице 9 показывают, что преципитирующие антитела обнаруживали в сыворотках на 7-й день после вакцинации, а в дальнейшем к 14-му дню у отдельных животных они достигали активности в разведении 1:8. В РН и ИФА у вакцинированных овец появляются вируснейтрализующие антитела уже на 3-ие сутки после вакцинации, средние титры которых составили  $0,5 \pm 0,37 \log_2$  и  $2,5 \pm 1,0 \log_2$ , соответственно. Затем наблюдали нарастание уровня антител. Так, на 5-й день после вакцинации титры антител в РН были на уровне  $1,36 \pm 0,34 \log_2$ , и в ИФА -  $4,0 \pm 1,6 \log_2$ , а на 10-й день -  $2,45 \pm 0,83$  и

6,21±0,71 лог<sub>2</sub>, соответственно. К 14-му дню они достигали значений 3,38±0,42 и 6,8±0,93 лог<sub>2</sub>, соответственно.

Таблица 9

**Динамика накопления поствакцинальных антител в крови овец к вирусу оспы**

Хар-ка животных	Дни, после		Активность сывороток в		
			РДП	РН	ИФА
Вакцинированные	вакцинации	3	0	0,5±0,37	2,5±1,0
		4	0	1,0±0,34	2,75±0,5
		5	0	1,36±0,34	4,0±1,6
		6	0	1,08±0,17	4,75±0,5
		7	0-Ц	1,49±0,02	5,0±0,5
		9	0-1:4	1,99±0,33	5,91±0,6
		10	Ц-1:8	2,45±0,83	6,21±0,71
		14	Ц-1:8	3,38±0,42	6,8±0,93
	заражения	7	Ц-1:4	3,52±0,50	6,3±1,44
		14	Ц-1:4	3,58±0,26	6,4±1,04
Контрольные	заражения	7	1:2-1:4	>5,33	7,0±0,5
		14	1:32-1:64	5,5±0,5	>13,5

При изучении динамики накопления антител после заражения вакцинированных овец установлено, что на 7-й и 14-й день титры антител оставались неизменным и примерно составляли в РН 3,52±0,50 и 3,58±0,26 лог<sub>2</sub>, а в ИФА - 6,3±1,44 и 6,4±1,04 лог<sub>2</sub>, соответственно. Преципитирующие антитела выявлены в разведениях до 1:4.

У контрольных овец в период проявления клинических признаков титры антител были значительно выше, чем у вакцинированных и в РН они составляли >5,33 лог<sub>2</sub>, в ИФА - 7,0±0,5-13,5±0,5 лог<sub>2</sub>. Титры преципитирующих антител на 7-й день после заражения составили 1:2-1:4, а на 14-й день у одной переболевшей овцы - 1:64.

**Изучение колострального и поствакцинального иммунитета у ягнят от иммунизированных овцематок против оспы овец.** Для этого пяти суягным маткам вводили указанную вакцину подкожно в оптимальной прививной дозе за 8 и 9 дней до ягнения. В качестве контроля использовали суягных овцематок, которых заразили вирулентным вирусом оспы овец за 3 дня до окота. Через 14 дней после вакцинации животных заражали вирулентным вирусом оспы овец в той же дозе, что и контрольных овец.

От вакцинированных овцематок было получено 5, а от контрольных овец - 2 ягненка нормального физического развития. Все животные содержались в одном помещении совместно с заболевшими овцами. За опытными и контрольными животными вели наблюдение в течение 35 дней. В течение 10 дней у всех животных измеряли температуру тела.

Вакцинированные овцы и полученные от них ягнята, а также ягнята от заболевших овцематок в течение указанного срока наблюдения были здоровы и противостояли контактному заражению оспой. Контрольные овцы заболели оспой в генерализованной форме через 9 дней после заражения. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10

**Наличие колостральных антител в крови ягнят и их устойчивость при контактном заражении**

Животные			Титры антител в реакциях				Результаты контрольного заражения	
Возраст	Кол-во	Характеристика	РДП	РДСК	РН (лог <sub>2</sub> )	ИФА	метод	заболело
Овцематки	5	вакцинированные	н/а - 1:2	н/а	1,0 - 1,23	н/и	внутрикожный	-
Ягнята	5	от вакцинированных овцематок	н/а	н/а	2,66 - 2,78	1:20 - >1:80	контакт	-
Овцематка	2	зараженная вирусом оспы	1:32	1:160	6,0	1:640 - 1:1200	внутрикожный	+
Ягнята	2	полученные от больных овец	1:32	1:120 - 1:160	5,76 - 6,0	1:640 - 1:1200	контактный	-

Примечания: н/а - не активны;  
н/и - не исследовано;

"-" - не заболело  
"+" - заболело

В крови контрольных овец и полученных от них ягнят активность сывороток крови в РДП установлена в разведении 1:32, РДСК - 1:120 - 1:160, РН - 5,76 - 6,0 лог<sub>2</sub>, в ИФА - 1:640 - 1:1200.

Данные проведенных экспериментов указывают на возможность защиты ягнят, родившихся от вакцинированных против оспы овцематок, от заболевания оспой даже при их совместном содержании. Таким образом, при вакцинации суягных овцематок полученные от них ягнята были защищены от заболевания благодаря наличию колострального иммунитета.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при иммунизации суягных овцематок вакциной против оспы овец из штамма SP у полученного приплода образуется колостральный иммунитет достаточной напряженности, обеспечивающий защиту ягнят от заболевания. Вакцинация суягных овцематок возможна при проведении противозпизоотических мероприятий против данного заболевания.

Были исследованы сыворотки крови ягнят, привитых в 1-3-х месячном возрасте из хозяйств Нарынской области, взятые в различные сроки после вакцинации и от заболевших оспой ягнят для изучения поствакцинального иммунитета. Сыворотки крови ягнят исследовали в РН и ИФА. Результаты исследований приведены в таблице 11.

Таблица 11

**Титры антител в крови однократно вакцинированных и больных оспой ягнят**

№№ групп	Количество ягнят в опыте	Возраст ягнят при вакцинации, (мес.)	Сроки после вакцинации, (дни)	Активность сывороток (лог <sub>2</sub> )	
				РН	ИФА
1	15	1	30	0,25 ± 0,43	4,05 ± 0,78
2	31	2	60	0,47 ± 0,44	2,2 ± 0,68
3	8	3	40-50	0,94 ± 0,56	6,33 ± 1,23
4	8	больные	-	5,72 ± 0,38	9,5 ± 0,8

Как видно из данных таблицы 11, наиболее высокие титры антител выявлены через 40-50 дней после иммунизации у ягнят, привитых в 3-х месячном возрасте, которые в РН и ИФА соответствовали 0,94±0,56 и 6,33±1,23 лог<sub>2</sub>. Менее выраженное накопление антител установлено у ягнят 1 и 2-х месячного возраста через 30 и 60 дней после вакцинации. Титр антител у таких животных был 0,25±0,43 - 0,47±0,44 и 2,2±0,68 - 4,05±0,78 лог<sub>2</sub>, соответственно. Наличие невысокого уровня антител в крови молодняка объясняется возрастными особенностями животных и необходимостью проведения их ревакцинации согласно наставлению.

**Исследование колострального иммунитета у козлят, полученных от иммунизированных вирусвакциной из штамма ГК коз.** С этой целью у козлят спустя 7, 14 и 28 дней после рождения отбирали пробы крови для получения сыворотки, которую исследовали на наличие колостральных антител к вирусу оспы коз в РН и ИФА.

Результаты исследований сывороток крови козлят, полученных от вакцинированных коз (табл.12), показали наличие высоких титров антител,

которые практически соответствовали титру антител в крови матери. Так, в РН через 7 дней титр антител в крови козлят был 4,32 и 4,5, а у матерей - 4,66  $\log_2$ , в ИФА они соответствовали 1:64 - 1:256 и 1:256. Такой же уровень антител отмечали в течение 14 дней и в дальнейшем, спустя 28 дней он незначительно понижался и был в пределах значений в РН 3,5-3,76  $\log_2$  и ИФА - 1:64.

Полученные данные указывают на то, что иммунизация коз вирусвакциной против оспы коз из штамма ГК сопровождалось образованием колостральных антител у приплода.

Таблица 12

**Уровень колостральных антител в крови козлят,  
полученных от вакцинированных коз**

Половоз растные группы	Дни после рождения					
	7		14		28	
	РН ( $\log_2$ )	ИФА	РН ( $\log_2$ )	ИФА	РН ( $\log_2$ )	ИФА
Козы	4,66	1:256	4,5	1:256	4,33	1:64
Козлята	4,5	1:64-256	4,5	1:64-256	3,5	1:64

**Биологическая и иммуногенная активность вирусвакцины против оспы овец из штамма SP в процессе длительного хранения.** С целью определения сохранности биологической активности и иммуногенности вирусвакцины против оспы овец из штамма SP в процессе длительного хранения нами была проведена серия опытов. Для исследований было отобрано 2 серии вакцины, хранившейся при температуре 4-6<sup>0</sup>С в течение 18 и 21 месяцев, и 2 серии, хранившиеся при той же температуре 2 и 3 года с момента изготовления. Биологическую активность вакцины определяли в момент изготовления и после хранения путем титрования десятикратных разведений препарата на культуре клеток ПЯ. Результаты опытов обобщены в таблице 13.

Таблица 13

**Биологическая активность вирусвакцины против оспы овец  
в процессе хранения при температуре 4-8<sup>0</sup>С**

Номер серии вакцины	Срок хранения	Титр вируса, (lg ТЦД <sub>50</sub> /мл)	
		в момент изготовления	после срока хранения
1	3 года	5,67 ± 0,25	5,46 ± 0,27
5	2 года	5,35 ± 0,27	5,12 ± 0,31
6	21 месяц	5,26 ± 0,20	5,0 ± 0,24
9	18 месяцев	5,5 ± 0,25	5,0 ± 0,22

Данные таблицы 13 свидетельствуют, что даже при длительном хранении отмечено незначительное снижение биологической активности вакцины. Так, титр вируса в момент изготовления одной серии вакцины был  $5,5 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а после хранения в течение 18 месяцев он составил  $5,0 \pm 0,22$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Титр вируса другой серии вакцины при изготовлении был  $5,67 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а после хранения в течение 3 лет титр составлял  $5,46 \pm 0,27$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Таким образом, биологическая активность вакцины сохранялась в течение исследуемого срока хранения. Разница титра в момент изготовления и в процессе хранения составила в пределах 0,21-0,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в результате длительного хранения при температуре 4-6<sup>0</sup>С сухой культуральной вирусвакцины против оспы овец из штамма SP ее биологическая активность через 3 года снижается незначительно, а иммуногенность сохраняется в течение не менее 18 месяцев (срок наблюдения). Полученные данные свидетельствуют о возможности длительного хранения вакцины без существенного снижения специфической активности.

**Биологическая активность и иммуногенность вирусвакцины против оспы коз из штамма ГК в процессе длительного хранения.** Изучение биологической активности препарата показало, что при длительном хранении титр вируса в вакцине понижался незначительно (табл.14). Так, если в момент изготовления он соответствовал  $6,66 \pm 0,20$  -  $6,83 \pm 0,25$  lgТЦД<sub>50</sub>/мл, то при хранении в период от 14 месяцев до 2 лет он был в пределах  $6,5 \pm 0,22$  -  $6,66 \pm 0,24$  lgТЦД<sub>50</sub>/мл. Практически разница титра вируса в вакцине в процессе хранения составила 0,1-0,17 lgТЦД<sub>50</sub>/мл. При проверке иммуногенных свойств установлено, что при контрольном заражении все вакцинированные овцы были устойчивы к заболеванию. У контрольных животных на 5-6 сутки после заражения отмечали угнетение, отказ от корма, слабость, зуд на месте введения вируса и повышение температуры тела до 41,2<sup>0</sup>С. Контрольные животные пали на 7 сутки после заражения. У павших животных на месте введения вируса выявлены расчесы.

Таблица 14

**Титры вируса в вакцине против оспы коз и ее иммуногенная  
активность при длительном хранении**

№№ групп	Срок хранения вакцины	Титр вируса (в lgТЦД <sub>50</sub> /мл)		Результат контрольного заражения
		в момент изготовления	в процессе хранения	
1	14 месяцев	6,6±0,20	6,5±0,22	2/0
2	18 месяцев	6,83±0,25	6,66±0,24	–
3	2 года	6,66±0,27	6,5±0,26	–
Контроль				2/2

Проведенные исследования показали, что в процессе длительного хранения при температуре 4-8°C сухой культуральной вирусвакцины против коз из штамма ГК, полученной с использованием культуры клеток ПК, ее биологическая активность снижается незначительно, а иммуногенность сохранялась в течение не менее 14 месяцев (срок наблюдения).

### 3.6. Разработка метода ПЦР

В разделе изложены методы выбора праймеров для проведения ПЦР, оптимизация условий проведения ПЦР.

Специфичность тест-систем определяется исключительно структурой праймеров. Как правило, для их создания используют уникальные и наиболее консервативные участки генома, в которых отсутствуют гомологии с какими-либо другими объектами. Основные характеристики праймеров представлены в таблице 15.

Таблица 15

**Основные характеристики праймеров для ПЦР**

Праймер	Температура плавления, °C	Температура отжига, °C	Содержание G+C, %	Длина фрагмента, (п.н.)
KS-1.5	60	55	50	149
KS-1.6	60	55	55	

Для оптимизации условий постановки ПЦР нами была проведена серия предварительных экспериментов, в ходе которых учитывались следующие факторы: температура отжига праймеров, время денатурации, синтеза, концентрация праймеров, ионов магния и количество матрицы. В ходе экспериментов был подобран оптимальный температурный режим

ПЦР при проведении амплификаций фрагментов генома вирусов оспы овец и коз (табл. 16). Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 2,5% агарозном геле при напряжении 90-120 В до прохождения бромфеноловым синим 2-3 см от старта. Наличие фрагмента расчетной длины свидетельствовало о присутствии ДНК вируса в исследуемой пробе.

При исследовании образцов сыворотки крови овец и коз и патологического материала серологическими методами (в РИД и ИФА) и в “nested”-ПЦР с системой праймеров, были отобраны три группы образцов крови: положительные во всех реакциях (пробы №1-6); отрицательные во всех реакциях (пробы №7-9); отрицательные в серологических реакциях, но положительные в ПЦР (пробы №10-14) (табл. 17).

Таблица 16

**Оптимальный температурный режим проведения ПЦР при амплификации фрагментов вируса оспы овец**

№№ стадий	Стадия реакции	Температура	Время	Количество циклов
1	Денатурация	95°C	3 мин	1
2	Денатурация	94°C	30 с	30
	Отжиг	55°C	30 с	
	Синтез	73°C	30 с	
3	Синтез	72°C	5 мин	1

Затем эти же пробы исследовали с разработанными нами системами праймеров. Проведенные исследования показали, что сконструированная нами система праймеров позволяла выявлять фрагмент генома оспы овец и коз.

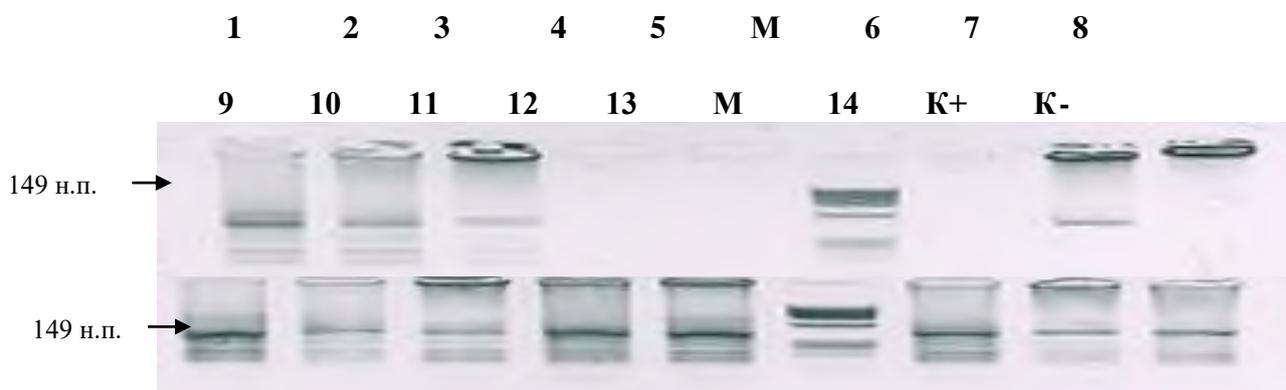
Таблица 17

**Результаты предварительного исследования проб крови в РИД, ИФА и ПЦР**

№ пробы	РИД	ИФА	ПЦР
1	+	+	+

2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	+
11	-	-	+
12	-	-	+
13	-	-	+
14	-	-	+

При использовании в ПЦР с другими разработанными парами праймеров нам не всегда удавалось избавиться от синтеза неспецифических фрагментов, поскольку матрицей в данном случае является клеточная ДНК. Наибольшую специфичность отмечали для KS-1 и KS-2, применение которой позволяет увеличить чувствительность метода.



**Рис. 2. Электрофорез продуктов:** *M* - Маркер; 1, 2, 3, 4, 5, 6 – положительные образцы в РИД, ИФА и ПЦР; 7, 8, 9, 10, 11 – отрицательные пробы в РИД и ИФА, но положительные в ПЦР; 12, 13, 14 – отрицательные во всех реакциях пробы.

Фрагмент амплифицированной ДНК длиной 149 н.п. обнаруживали визуально после электрофореза в 2% агарозном геле.

Таким образом, с целью упрощения и удешевления технологии постановки ПЦР-диагностики нами разработан метод обнаружения генома оспы овец и коз в крови с использованием одной пары праймеров, с помощью которых возможна индикация оспы овец и коз в анализируемом материале. Данные системы могут быть использованы для скрининга большого числа проб.

**Применение метода ПЦР для выявления ДНК ВОО в культурах клеток и патологическом материале. Проверка специфичности метода.** Для проведения исследований были выделены ДНК из вакцинного штамма SP оспы овец, двух штаммов оспы коз (ГК и Pellor). Кроме того, были использованы ДНК аденовируса КРС, герпесвируса КРС 1 типа (инфекционный ринотрахеит КРС), герпесвируса КРС 4 типа, парвовируса КРС и лейкоза КРС, а также 2 штамма оспы птиц (КВ-ЭМ и К) в качестве контроля.

При тестировании проб нами использовано разное количество ДНК, для проведения ПЦР. Результаты данных исследований представлены в таблице 18.

Таблица 18

### Результаты исследования проб методом ПЦР

Вирус	Штамм	Количество проб		
		2,5 мкл	5 мкл	10 мкл
Оспы овец	SP	+	+	+
Оспы коз	ГК	+	+	+
Оспы коз	Pellor	-	+	+
Оспы птиц	КВ-ЭМ	-	-	-
Оспы птиц	К	-	-	-

Как установлено, с помощью метода ПЦР нам удалось выявить специфический фрагмент ДНК оспы овец и коз (пробы 1-3). Данный специфический фрагмент не был выявлен в отрицательных контролях (пробы 4,5). Это еще раз доказывает специфичность предложенного метода.

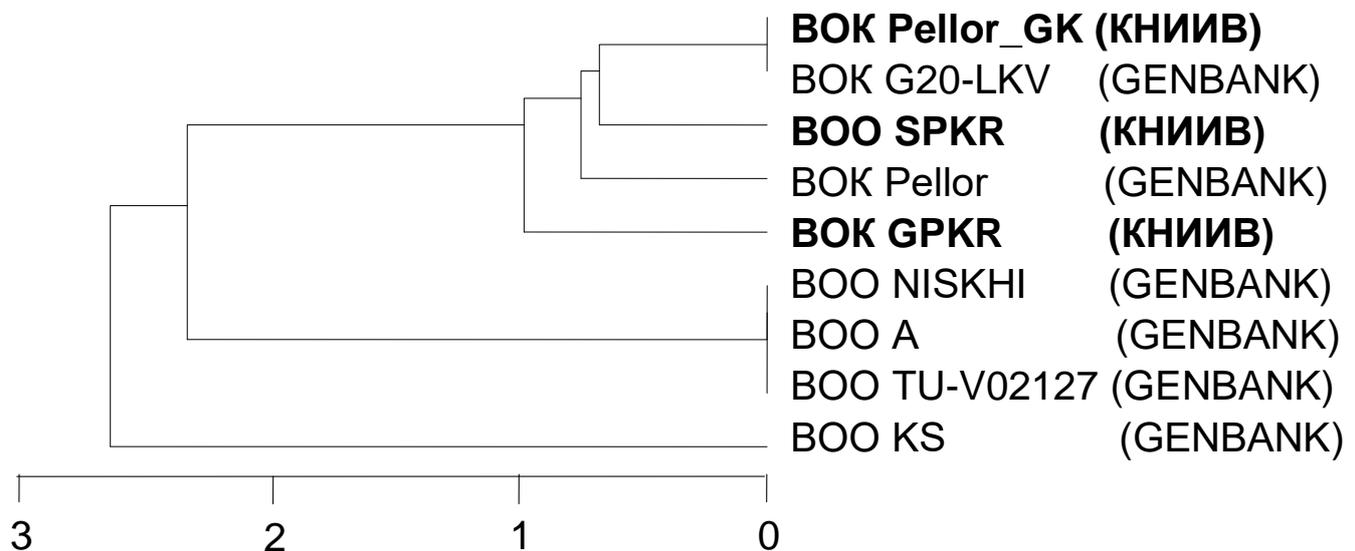
Положительные результаты получены только в двух пробах (1 и 2). В остальных пробах, которые использовались в качестве отрицательного контроля, получили ожидаемые результаты. Полученные результаты подтверждают данные других исследователей, согласно которым с помощью указанной пары праймеров не удастся обнаружить специфический фрагмент в ДНК вирусов других семейств.

**Определение первичной структуры амплифицированных фрагментов гена N1.** Определение первичной структуры продуктов ПЦР после амплификации ДНК, выделенной из культуры клеток ПЯ и ПК, инфицированной вирусом оспы овец или вирусом оспы коз проводили с целью подтверждения специфичности полученных фрагментов. С использованием праймеров KS-1,5 и KS-1,6 были секвенированы фрагменты, полученные путем амплификации клеточной ДНК из вируспродуцирующей культуры с вышеуказанными праймерами. На рисунках 3 и 4 приведено сравнение нуклеотидной последовательности

секвенированных фрагментов размером 149 п.н. с опубликованными в GenBank последовательностями. Как видно из представленных на рисунке 4 данных, секвенированными нами фрагмент ДНК штамма Pellor имеет одну замену в положении 73 по сравнению с опубликованной последовательностью Pellor. Это говорит о том, что в процессе адаптации штамма к культуре клеток ПК возможно произошло изменение нуклеотидной последовательности данного штамма.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55
BOO A.	GTGTGACTTT	CCTGCTGAAT	TAAAGATGG	GATGTCGCA	TCTTCACTTG	TTGGTATAAA
BOO TU-V02127	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO NISKHI	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO KS-1	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BOO SP	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BOK Pellor	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BOK Pellor1	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BOK G20-LKV	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BOK GP	.....	.....C.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	65	75	85	95	105	115
BOO A.	TCATAATTCT	GGACCTAGAG	CTATTTTGGG	ATGCGCACAA	GCAAAGCAGG	CCATATCTTG
BOO TU-V02127	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO NISKHI	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO KS-1	.....	.....C.....	.....	.....G.....	CG.....	.....
BOO SP	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
BOK Pellor	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOK Pellor1	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
BOK G20-LKV	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
BOK GP	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	125	135	145	.....	.....	.....
BOO A.	TTTAAGTTCA	GATATACGAA	ATAAAATAG	.....	.....	.....
BOO TU-V02127	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO NISKHI	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO KS-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOO SPKR	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOK Pellor	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOK Pellor_GK	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOK G20-LKV	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BOK GPKR	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Рис. 3. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена N1 различных изолятов вирусов оспы овец и коз**



процент нуклеотидных различий (в%)

**Рис. 4. Дендрограмма, отражающая уровень отличий различных штаммов ВОО и ВОК, полученная сравнением нуклеотидных последовательностей участка гена N1.**

В то же время культуральный штамм SP ВОО больше соответствует группе оспы коз, нежели группе оспы овец, если не учитывать замену в положении 49 (Рис 3 и 4). Данный штамм был получен при адаптации полевого изолята к культурам клеток ПЯ и ПК. Как известно, культура клеток ПК получена из почек козленка, и возможно при адаптации данного штамма к гетерогенной культуре клеток произошло изменение нуклеотидной последовательности штамма.

Из представленных на рисунке 4 данных секвенированных нами фрагмент штамма GPKR почти полностью совпадает с опубликованными последовательностями оспы коз, за исключением замены в положении 73.

Таким образом, проведенные нами исследования по воспроизведению ранее разработанного метода оптимизации условий постановки ПЦР показали пригодность данного метода для выявления ВОО. Определение первичной последовательности показало наличие последовательности, характерной для вируса оспы овец и вируса оспы коз. Однако с помощью секвенирования невозможно провести дифференциацию между оспой овец и оспой коз.

### **3.7 Разработка сэндвич-варианта ИФА для выявления вируса оспы овец**

В данном разделе изложена технология создания тест-системы, использующей принцип сэндвич-варианта ИФА, предназначенной для выявления вируса оспы овец и определения его титра в пробах биологического материала.

В опытах установили, что рабочим титром специфической кроличьей сыворотки являлось разведение 1:4000, специфического контрольного антигена - 1:200, овечьей сыворотки - 1:2000 и конъюгата - 1:1000.

Для оптимизации условий постановки сэндвич-варианта ИФА определяли температуру и время иммобилизации кроличьей сыворотки на планшетах, температуру и время экспонирования исследуемых образцов антигена и сыворотки овец. При исследовании влияния температуры и

времени экспозиции на сорбцию сыворотки в лунках испытывали режимы иммобилизации в течение 16-18 часов при 4<sup>0</sup>С и двух часов - при 37<sup>0</sup>С. Полученные результаты позволили считать, что процессы сорбции сыворотки при данных условиях не имели принципиальных различий. Поэтому сочли, что в технологическом аспекте целесообразнее использовать режим иммобилизации сыворотки в течение 16-18 часов при 4<sup>0</sup>С. Для последующих стадий реакции время экспонирования должно составлять 1 час при 37<sup>0</sup>С.

Результаты испытаний тест-системы на основе сэндвич-варианта ИФА представлены в материалах диссертации.

**Разработка тест-системы ИФА на основе непрямого варианта для определения уровня антител против оспы овец** изложена разработка иммуноферментной тест-системы для выявления вирусспецифических антител в сыворотке крови при диагностике оспы овец и изучении иммунного статуса, позволяющего проводить массовые исследования, которая коррелировала бы с общепринятыми серологическими методами выявления антител. За основу был выбран не прямой вариант ИФА.

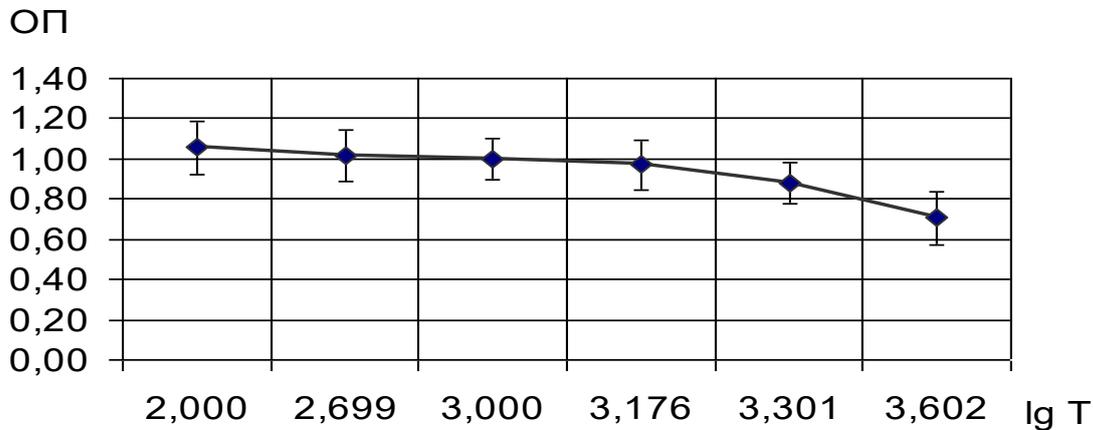
На начальном этапе работы необходимо было определить требования к специфическим реагентам, входящим в состав тест-системы.

При постановке непрямого варианта ИФА важную роль играет получение очищенных вирусных препаратов, чтобы исключить возможность неспецифических взаимодействий, а также обеспечить специфичность контрольных сывороток. Новизна нашего непрямого варианта заключалась в разработке метода очистки вируса оспы овец. Известно, что большинство вируссодержащих суспензий и антигенов против оспы овец содержат большое количество балластных белков и липидов. Очистка их хлороформом, эфиром и спиртом неприемлема (64), т.к. эти вещества разрушают вирус. Поэтому наиболее часто используются такие методы очистки, как центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия, сахарозы и глицерина.

Для оптимизации условий постановки непрямого варианта ИФА определяли концентрацию антигена для иммобилизации на планшете, а также температуру и время экспозиции исследуемых сывороток.

**Определение рабочего титра иммобилизуемого антигена.** Устанавливали оптимальную концентрацию иммобилизуемого антигена. Для этого в 5ти повторностях исследовали интенсивность реакции специфической сыворотки крови кроликов с постоянным разведением 1:800 с различными концентрациями очищенного антигена. Применяли метод последовательных разведений, которые вносили в лунку в объеме по 100 мкл и сорбировали в течение 16-18 часов при температуре 4<sup>0</sup>С. Учет реакции проводили по значениям оптических показателей.

Распределение средних оптических показателей (ОП) реакции соответственно испытанным разведениям антигена представлены графически на рисунке 5.



**Рис. 5. Распределение оптических показателей (ОП) специфической сыворотки крови кролика соответственно разведениям иммобилизованного антигена (lg T).**

Представленные на рисунке 5 результаты показывают, что эффективность реакции зависела от концентрации иммобилизованного антигена. В разведениях с 1:100 ( $\lg T=2,0$ ) до 1:1000 ( $\lg T=3,0$ ) наблюдали "эффект плато", который возможно свидетельствовал об избытке антигена в лунке. Затем происходило падение оптического показателя (с 1:1500). На этом основании концентрацию антигена, соответствующую разведению 1:1000, считали рабочим титром.

Таким образом, в результате проведенных исследований определили рабочий титр антигена, соответствующий разведению 1:1000 при иммобилизации его на поверхности планшета в 0,1М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,5-9,6 в течение 16-18 часов при температуре 4<sup>0</sup>С. Для последующих стадий ИФА время экспозиции было 60 минут при 37<sup>0</sup>С с использованием 0,05М трис-НСl с 0,02М NaCl буферного раствора. В опытах также было установлено, что 10% раствор лошадиной сыворотки являлся экономически выгодным для использования в качестве блокирующего раствора.

**Практическое применение разработанной тест-системы ИФА.** При выполнении данного этапа работы нами были проведены исследования сывороток крови овец различных возрастных групп, полученных в разные сроки после вакцинации, заражения, иммунизации, от клинически больных и переболевших оспой животных. Результаты активности исследованных сывороток представлены в таблице 19.

### Титры антител в крови вакцинированных и переболевших овец и ягнят

Половозрастные группы		Сроки после вакцинации и переболевания	Активность сывороток в			
вид, возраст	Кол-во в группе		ИФА (лог <sub>2</sub> )	РН (лог <sub>2</sub> )	РДП	РДСК
овцы (разн.возр)	20	13 дней	4,5±0,9	1,18±0,43	0 - Ц	0 - Ц
овцы, 3-4 года	22	14 дней	5,5±1,2	2,44±0,57	0 - 1:4	0 - 1:5
бараны и валухи	60	30-40 дней	7,52±0,68	1,77±0,78	0 - 1:4	0
ягнята, 5-6 мес.	8	40 - 50 дней	6,33±1,23	0,94±0,56	н/и	н/и
ягнята (разн.возр)	31	2 месяца	4,05±0,78	0,47±0,44	н/и	н/и
овцематки 2 года	12	9 месяцев	6,97±0,97	1,67±1,37	0-Ц	0
овцематки 2 года	31	10 месяцев	5,35±0,93	1,12±0,82	0 - Ц	0 - 1:5
бараны	12	больные	10,13±0,66	5,26±0,34	Ц - 1:64	1:30-1:80
овцематки	15	больные	10,17±0,81	5,22±0,51	Ц - 1:16	1:20-1:60
ярки	14	больные	7,35±0,85	4,82±0,52	Ц - 1:32	1:20-1:60
овцы (разн.возр)	5	больные	9,05±0,5	3,93±0,72	1:8-1:32	1:20-1:80
ягнята, 1,5-2 мес.	15	больные	9,5±0,8	5,72±0,38	н/и	н/и
овцематки (разн.возр)	15	3 мес. после переболевания	7,1±0,98	3,52±1,29	Ц - 1:4	н/и

Уровень антител в крови животных зависел от сроков вакцинации и возраста овец. Так, титры антител в ИФА через 13-14 дней достигали значений  $4,5 \pm 0,9$  -  $5,5 \pm 1,2$  лог<sub>2</sub> и в РН -  $1,18 \pm 0,43$  -  $2,44 \pm 0,57$  лог<sub>2</sub>. В дальнейшем, через 30-40 дней, 9 и 10 месяцев после вакцинации титры антител в сыворотке крови взрослых овец составили  $5,35 \pm 0,93$  -  $7,52 \pm 0,68$  лог<sub>2</sub> и  $1,12 \pm 0,82$  -  $1,77 \pm 0,78$  лог<sub>2</sub>, а в крови ягнят через 40-60 дней после вакцинации -  $4,05 \pm 0,78$  -  $6,33 \pm 1,23$  и  $0,47 \pm 0,44$  -  $0,94 \pm 0,56$  лог<sub>2</sub>, соответственно. В РДП и РДСК антител в крови вакцинированных животных в указанные сроки не выявляли или они были в пределах 1:4 и 1:5 соответственно.

Титры антител в крови больных и переболевших животных были значительно выше, чем у вакцинированных и составляли в ИФА  $7,35 \pm 0,85$  -  $10,17 \pm 0,81$  лог<sub>2</sub> и в РН -  $3,93 \pm 0,72$  -  $5,72 \pm 0,38$  лог<sub>2</sub>, соответственно. Титры преципитирующих и комплементсвязывающих антител были в пределах Ц-1:64 и 1:20-1:80, соответственно.

Следует отметить, что метод ИФА по сравнению с РН требует меньше времени для постановки, экономичен в плане использования

компонентов, легко воспроизводим и наиболее удобен для повседневного анализа образцов сыворотки на наличие специфических антител.

## ВЫВОДЫ

1. Проведенный эпизоотологический анализ по оспе овец по отчетным и статистическим данным департамента государственной ветеринарии Кыргызской Республики и собственным материалам за 2000-2009 гг. показал, что заболевание было широко распространено по всей территории Кыргызской Республики. Ежегодно регистрировались новые очаги заболевания овец оспой.

2. Выделен местный штамм SP от больных оспой овец и штамм ГК оспы коз и изучены их иммунобиологические свойства для изготовления биологических препаратов.

3. Отработаны оптимальные условия культивирования вакцинного штамма SP вируса оспы овец и вируса оспы коз из штамма ГК в культурах клеток ПЯ и ПК, обеспечивающие получение высококонцентрированного вирусного материала, пригодного для получения вирусвакцины против оспы овец и коз и изготовления специфического антигена для диагностических целей.

4. Установлена возможность использования культур клеток ПЯ и ПК для получения диагностических антигенов полевых изолятов вирусов оспы овец и коз.

5. Разработан и изготовлен единый антиген для серологической диагностики оспы овец (методом РДСК и РДП).

6. Разработана тест-система ИФА на основе непрямого варианта для выявления антител к вирусу оспы овец в сыворотке крови.

7. Разработан и изготовлен набор для диагностики оспы овец методом сэндвич-варианта ИФА, в состав которого вошли специфические кроличья и овечья сыворотки, очищенные специфический и нормальный антигены и коммерческий пероксидазный антиовечий конъюгат.

8. Разработана тест-система ПЦР для выявления специфического фрагмента геномов вирусов оспы овец и коз.

9. Установлено, что сухая вирусвакцина против оспы овец из штамма SP при лабораторных и производственных испытаниях обладает высокими защитными свойствами для животных различных возрастных групп по сравнению российскими и казахскими вакцинами. Значения доли положительно реагирующих сывороток, равное 0,923 и среднего титра сывороточных антител, равное 1,97  $\log_2$ , при которых защищенность овец от заболевания оспой составила 99%.

10. Установлено, что сухая вирусвакцина против оспы овец из штамма SP при лабораторных и производственных испытаниях обладает

высокими защитными свойствами для животных различных возрастных групп по сравнению российскими и казахскими вакцинами.

11. Экспериментально установлено, что иммунизация суягных овцематок вакциной из штамма SP обеспечивает создание колострального иммунитета у ягнят, который предохраняет их от заражения оспой овец в течение первого месяца жизни (срок наблюдения).

12. Установлено, что иммунобиологические свойства сухой вирусвакцины против оспы овец из штамма SP сохраняются в течение 18 месяцев при температуре 4-6<sup>0</sup>С (срок наблюдения).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Нормативно-технические документы «Культуральную вирусвакцину против оспы коз из штамма ГК» и «Культуральную вирусвакцину против оспы овец из штамма SP»
2. Нормативно-технические документы на "Набор для диагностики оспы овец методом иммуноферментного анализа (ИФА)" и на "Набор для серологической диагностики оспы овец" (методами РДСК и РДП).
3. Для диагностики ветеринарных лабораторий:  
 Методические указания по выявлению и идентификации вируса оспы овец в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа.  
 Методика по получению антигена вируса оспы овец для иммуноферментного анализа.  
 Методика по выявлению антител к вирусу оспы в сыворотке крови овец в непрямом варианте иммуноферментного анализа.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Джапаралиев Н.Т. Оспа овец и коз // Вестник Кыргызского аграрного университета. – Бишкек, 2004.- №3. - С.111-114.
2. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Жапаралиева М.Т. Репликация вируса оспы коз и овец // Вестник Кыргызского аграрного университета. – Бишкек, 2004.- №3. - С.114-117.
3. Джапаралиев Н.Т. Применение метода ПЦР для выявления ДНК // Материалы второй Международной конференции. - Алматы, 2005. - С. 132-137.

4. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т. Разработка и воспроизведение метода ПЦР для выявления вируса оспы овец и коз // Материалы второй Международной конференции. - Алматы, 2005. - С. 178-182.
5. Джапаралиев Н.Т. Выделение вируса оспы коз //Ж. Ветеринария. – Душанбе, 2005. – №2. - С. 25-27.
6. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З. Культивирование вируса оспы коз //Ж. Ветеринария. – Душанбе, 2005. – №2. - С. 27-29.
7. Джапаралиев Н.Т. Возможность использования метода ПЦР для выявления ДНК генома вируса оспы овец и коз в культурах клеток и патологическом материале //Ж. Ветеринария. – Душанбе, 2006. – №2. - С. 28-31.
8. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т. Воспроизведение метода ПЦР для выявления фрагментов генома вируса оспы овец и коз// Ж. Ветеринария. – Душанбе, 2006. - №1. – С. 32-35.
9. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т. Оптимизация полимеразной цепной реакции для обнаружения фрагментов генома вируса оспы овец и коз// Вестник Кыргызского аграрного университета. – 2005. - №1. – С.66-68.
10. Джапаралиев Н.Т. Секвенирование фрагментов гена N1 вирусов оспы овец и коз // Вестник Кыргызского аграрного университета. – 2005. - №1. – С.73-75.
11. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т., Жапаралиева М.Т. Культивирование вакцинных штаммов SPKR и GPKR вирусов оспы овец и коз // Материалы Международной научно-практической конференции. - Алматы, 2006. – С. 112-116.
12. Джапаралиев Н.Т. Культивирование штамма GPKR вируса оспы коз // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ. – Бишкек, 2007. - №1. – С.190-193.
13. Джапаралиев Н.Т. Методы диагностики оспы овец и коз // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ. – Бишкек, 2007. - №1. – С.193-196.
14. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т. Иммунобиологические свойства вирусвакцин против оспы овец и коз из местных штаммов // Материалы Международной ветеринарной научно-практической конференции. - Бишкек, 2007. - С.67-69.
15. Джапаралиев Н.Т. Использование метода ПЦР для диагностики оспы овец и коз // Материалы научной конференции КазНИВИ. – Алматы, 2007. - С.122-125.

16. Джапаралиев Н.Т. Разработка вакцин против оспы овец // Материалы научной конференции КазНИВИ. – Алматы, 2007. - С.126-128.
17. Акматова Э.К., Мамытова А.Т., Джапаралиев Н.Т. Сравнительная характеристика серологических реакций для исследования оспы овец // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ. – Бишкек, 2008. - №3. – С. 118-121.
18. Джапаралиев Н.Т. Динамика накопления антител в крови овец вакцинированных против оспы овец // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ. – Бишкек, 2008. - №3. – С. 121-123.
19. Джапаралиев Н.Т. Разработка сэндвич варианта ИФА для выявления вируса оспы овец // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ. – Бишкек, 2008. - №3. – С. 123-125.
20. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Кожоналиев Т.Т., Культивирование штаммов вируса оспы овец и коз // Материалы Международной научно-практической конференции. - Алматы, 2008. – С.75-77.
21. Джапаралиев Н.Т. Приготовление экспериментальной серии вакцин против оспы овец из местного штамма SP // Материалы Международной научно-практической конференции. - Алматы, 2008. – С.317-318.
22. Нургазиев Р.З., Крутская Е.Д., Джапаралиев Н.Т. Чувствительность постановки полимеразной цепной реакции при исследовании клинических образцов // Материалы Международной научно-практической конференции. - Алматы, 2008. – С.371-375.
23. Джапаралиев Н.Т. Секвенирование фрагментов гена N1 оспы овец и коз // Материалы Международной научно-практической конференции Биобезопасность. – Семипалатинск, 2009. - С. 171-176.
24. Джапаралиев Н.Т. Изучение эпизоотической ситуации по оспе овец в Кыргызской Республике контроля биологической и иммуногенной активности вирусвакцины против оспы овец // Материалы Международной научно-практической конференции Биобезопасность. – Семипалатинск, 2009. - С. 169-171.
25. Джапаралиев Н.Т. Обнаружение оспы овец и коз с помощью метода ПЦР // Вестник науки Казахского агротехнического университета им.С.Сейфулина. - Астана, 2009. - №4. – С. 174-179.
26. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Мусуралиев К.К., Кожоналиев Т.Т., Мамытова А.Т. Разработка метода ПЦР для выявления оспы овец и коз // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфулина. - Астана, 2009. - №4. – С. 202-207.

27. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Мусуралиев К.К., Кожоналиев Т.Т., Мамытова А.Т. Разработка сэндвич-варианта ИФА для выявления вируса оспы овец // Научный журнал. Исследования Результаты - Алматы, 2009. - №4. – С. 8-11.
28. Джапаралиев Н.Т. Изучения эффективности вирусвакцины против оспы овец и коз в лабораторных и производственных условиях // Вестник ПГУ. - Павлодар, 2009. – С. 59-66.
29. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З. Мусуралиев К.К., Кожоналиев Т.Т., Мамытова А.Т.. Разработка вакцины против оспы коз на основе местного штамма ГК// Вестник ПГУ. - Павлодар, 2009. – С. 66-73.
30. Джапаралиев Н.Т. Изучение колострального и поствакцинального иммунитета у ягнят и козлят против оспы овец и оспы коз // Ж. Исследования Результаты - Алматы, 2009. - №4. – С. 5-8.
31. Джапаралиев Н.Т. Выделение вирусов оспы овец и коз и проведение исследований по их адаптации // Ж: Гигиена, эпидемиология и иммунология - Алматы, 2009. - №4. - С. 158-162.
32. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З. Мусуралиев К.К., Кожоналиев Т.Т., Мамытова А.Т. Биологическая активность разработанных вакцин // Ж. Гигиена, эпидемиология и иммунология. - Алматы, 2009. - №4. - С. 155-158.
33. Джапаралиев Н.Т. Изучение иммунобиологических свойств вакцин против оспы овец и коз из местных штаммов // Вестник науки КазАТУ им.С.Сейфулина. - Астана. 2010. - №1- С. 174-179
34. Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Мусуралиев К.К. Результаты контроля и изучения эффективности вакцин против оспы овец и коз в лабораторных и производственных условиях // Вестник науки КазАТУ им.С.Сейфулина. - Астана. 2010. - №1 – С. 200-207

Джапаралиев Нурлан Тынчтыкбековичтин «**КОЙ МЕНЕН ЭЧКИНИН КУЛ ЫЛАНЫНА ДИАГНОСТИКА ЖУРГУЗУУНУН ЖАНЫ ЫКМАСЫН ЖАНА АНЫН АТАЙЫН АЛДЫН АЛУУСУН ИШТЕП ЧЫГУУ**» темасында биологиялык илимдеринин доктору даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микотоксикологиялуу микология жана иммунология адистиги боюнча

## РЕЗЮМЕСИ

**Негизги сөздөр:** койдун күлү, эчкини күлү, эпизоотология, диагностика, серология, изолятар, штаммдар, молекулярдык биология, атайын профилактика, вакциналар, штаммдар, колостралдык иммунитет.

**Изилдөөнүн объектиси:** кой жана эчки, кандын сары суусу, биологиялык препараттар.

**Иштин максаты:** биологиялык материалда жана кандын сары суусунда вирусспецификалык антикаражаттарын табуу үчүн кой менен эчкинин диагностикасын иштеп чыгуу жана анын технологиясын жанылатту. Бул иштин негизги максаты кой жана эчкинин күлүно каршы атайын алдыналуу каражаттарын иштеп чыгуу.

**Изилдөөнүн ыкмалары:** эпизоотологиялык мониторинг, клиникалык, серологиялык, молекулярдык биологиялык, иммуно-биологиялык, биометриялык жана статистикалык.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы:** Кыргыз Республикасында биринчилерден болуп, кой жана эчкинин SP жана ГК штаммдарын жаны ПЯ менен ПК трипсинделген клеткаларына остүрүш каражаттары оптимизацияланган. Андан тышкары серологиялык реакцияларды жургузгонго кой менен эчкинин спецификалык антигендери жана гипериммундук кандын сары суусу иштелип чыкты. Кой менен эчкинин күлүно каршы жергиликтүү штаммдардан жасалган вакциналар иштелип чыгарылды, аларга патенттер алынды (№2144377, 2009; 2144378, 2009).

**Колдонуу чөйрөсү:** илимий изилдоо институттарына, республиканын диагностикалык борборлоруна, практикалык ветеринария кызматына жана ветеринардык окуу жайларына сунушталат.

## РЕЗЮМЕ

диссертации Джапаралиева Нурлана Тынчтыкбековича на тему: **«РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ И КОЗ»** на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Ключевые слова:** оспа овец, оспа коз, эпизоотология, диагностика, серология, изоляты, штаммы, молекулярная биология, специфическая профилактика, вакцины, колостральный иммунитет.

**Объект исследования:** мелкий рогатый скот (овцы и козы), сыворотка крови, биологические препараты.

**Цель работы:** разработка и совершенствование технологии изготовления средств диагностики оспы овец и коз для обнаружения вирусспецифического антигена в пробах биологического материала и выявления антител в сыворотке крови; разработка средств специфической профилактики оспы овец и коз.

**Методы исследований:** эпизоотологический мониторинг, серологический, молекулярно-биологический, иммунобиологический, клинический, биометрический, статистический.

**Полученные результаты и их новизна:** оптимизированы условия культивирования вакцинных штаммов вирусов оспы овец SP и коз ГК на первично-трипсинизированной культуре клеток ПЯ и ПК. Впервые получены специфические антигены и гипериммунные сыворотки к вирусам оспы овец и коз, пригодные для постановки серологических реакций. Разработаны тест-системы ИФА и ПЦР для диагностики оспы овец и коз. Разработаны вакцины против оспы овец и коз с использованием местных штаммов, на которые получены патенты (№ 214437, 2009 и № 2144378, 2009).

**Область применения:** научно-исследовательские институты, республиканские диагностические центры, практическая ветеринарная медицина, ветеринарная вирусологическая наука, в учебном процессе высших учебных заведений биологической спецификации.

## **The RESUME**

Dzhaparaliev Nurlan Tynchtykbekovich

### **DEVELOPMENT OF MODERN METHODS OF DIAGNOSIS AND SPECIFIC PROPHYLAXIS OF SHEEPPOX AND GOATPOX**

06.02.02 – veterinary microbiology, virology, epizootology, micology with micotoxicology and immunology

**Keywords:** sheeppox, goatpox, epidemiology, diagnosis, serology, isolates, strains, molecular biology, specific prophylaxis, vaccines, immunology, colostrum immunity.

**Object of research:** small ruminants (sheep and goats), blood of serum, biological and immunologicals.

**The purpose of work:** the aim of this issue are development and improvement of technology of preparation of kits for diagnose pox of different animals for identification virusspecific antigens at the serum of blood. The main idea of this issue is development new vaccines against sheeppox and goatpox.

**Methods of researches:** the epidemiologic monitoring, serologic, molecular biologic, immunobiologic, biometric, and statistic.

**The received results and their novelty:** for the first time in the Kyrgyz Republic it is optimized condition of cultivation of vaccine strains SP and GK of sheeppox and goatpox at the freshly trypsinized cell cultures CC and GC. First time received specific antigens and hypetimmune serums to sheeppox and goatpox, which are suitable for serological reactions. Also were developed ELISA and PCR test-kits with using local strains of sheeppox and goatpox, which were patented (#2144377, 2009 and #2144378, 2009).

**Scope:** research institutes, republican diagnostic centers, cattle-breeding facilities of republic with different patterns of ownership and an educational institution of a veterinary structure.