

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

**Кыргызский национальный аграрный университет
имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.11.037

На правах рукописи

УДК 619:578.821.21

МАМЫТОВА АЙГУЛЬ ТАБАЛДЫЕВНА

**СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСПЫ ОВЕЦ И
РАЗРАБОТКА ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА
ИЗ МЕСТНОГО ШТАММА**

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

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2013

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 фермерских хозяйства Кыргызской Республики.

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

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Усманов Рафик Каримович

кандидат ветеринарных наук,
Искембаева Гулмайрам Асановна

Ведущая организация: Казахский национальный аграрный
университет, г. Алматы, Республика Казахстан

Защита диссертации состоится " 19 " апреля 2013 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д.06.11.037 при КНАУ им. К.И.Скрябина 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. О. Медерова, 68.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2013 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,**

Е.Д. Крутская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Оспа овец острая контагиозная болезнь, протекающая с характерными папулезно-пустулезными поражениями кожи морды, других участков кожи со слабым волосяным покровом (экзантема) и слизистых оболочек. Вирусная инфекция мелкого рогатого скота характеризуется острым течением, поражением органов дыхания, пищеварения и другими симптомами. Оспа способна вызывать массовые эпизоотии и наносить огромный экономический ущерб животноводству, в виде потери живой массы, настрига шерсти и гибели до 20-30 % больных животных.

Эпизоотическая ситуация в Кыргызстане по оспе овец в последние годы остается достаточно напряженной. Применяемые в настоящее время молекулярные методы диагностики болезни не трудоемки и занимают мало времени, что обеспечивает своевременную постановку диагноза. Но при проведении массовых эпизоотологических обследований используются более специфичные и достоверные серологические методы диагностики, так как они в экономическом плане имеют преимущество перед молекулярно-биологическими методами. Поэтому совершенствование диагностики и специфической профилактики оспы овец является актуальной задачей [Н. Джапаралиев, 2011].

По официальным данным вспышки оспы овец наблюдались в 2002 году в Таласской области. В 2006 году в Баткенской области были зарегистрированы новые вспышки оспы овец, которые далее распространились в Ошскую и Джалал-Абадскую области. Весной 2008-2009 г.г. оспа овец была зарегистрирована в Джумгалском районе, пастбища которого граничат с южными областями республики. В этом же году единичные случаи заболевания были в Кочкорском районе. В 2011 году оспа овец отмечалась в Атбашинском, и Тонском районах, а также на скотном рынке г.Токмак Чуйской области. В 2012 году были единичные случаи в Джалал-Абадской области [Н. Джапаралиев, 2011].

Проблема борьбы с оспой овец в Кыргызской Республике посвящены исследования отечественных ученых Белекова Т.Б., Нургазиева Р.З., Джапаралиева Н.Т., Иманова Э.Д., Жунушева А.Т.

В борьбе с оспой овец необходима быстрая и точная диагностика заболевания, и организация оперативных мероприятий, направленных на купирование и ликвидацию очага инфекции. Своевременная диагностика и меры специфической профилактики являются основополагающими инструментами в борьбе с оспой животных. Основным методом распознавания инфекционных болезней является лабораторная диагностика определения вида возбудителя.

Массовая диагностика с применением серологической диагностики на основе иммуноферментного анализа имеет особую значимость и

актуальность. Так как благодаря этому возможно быстрое выявление вируса и установление наличие специфических антител в сыворотке крови животных. Важную роль в предотвращении оспенной инфекции играет вакцинопрофилактика. В ветеринарной практике для специфической профилактики оспы применяются вакцины, изготовленные из инактивированных и живых штаммов разных типов возбудителя. Однако, как показывают последние исследования, такие вакцины не всегда эффективны, поскольку изготовлены не из тех штаммов, циркулирующих конкретно в республике, и не соответствуют по антигенным свойствам эпизоотическим вирусам. В этой связи актуальной проблемой в борьбе с оспой овец является изготовление отечественных противооспennых вакцин из местных эпизоотических штаммов.

Связь темы диссертации с основными научно-исследовательскими работами. Научно-исследовательская работа, выполненная соискателем, является составной частью проблемы «Мониторинг оспы овец и интеграция современных методов диагностики с применением серологических и молекулярно-биологических методов», номер госрегистрации – 0005818, лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева.

Цель и задачи исследования. Определить иммунобиологические свойства штамма "Күл" вируса оспы выделенного на территории Кыргызской Республики, изготовить опытную серию вакцинного препарата на базе данного местного штамма. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. изучить эпизоотическую ситуацию в республике по оспе овец;
2. изучить в сравнении применяемые серологические реакции при исследовании оспы овец;
3. изучить иммунобиологические свойства выделенного вируса;
4. провести адаптацию выделенного вируса на различных культурах клеток (ПЯ, ТЯ, ВНК-21);
5. изготовить лабораторную серию вакцины против оспы овец из штамма "Күл" и испытать её на лабораторных животных.

Научная новизна работы. Впервые в Кыргызской Республике получен местный штамм вируса оспы. Изучены иммунобиологические свойства вируса из штамма "Күл", выделенного в 2009 году на территории Кыргызской Республики. Изготовлена опытная серия сухой аттенуированной вакцины против оспы овец из штамма "Күл" и изучены её иммуногенные свойства.

Новизна полученных результатов подтверждена патентом № 1357 от 29 апреля 2011 года.

Практическая значимость полученных результатов. Выделенный и адаптированный местный штамм вируса оспы овец использован при изготовлении сухой аттенуированной вакцины против оспы овец из штамма

"Күл". Разработана рекомендация по борьбе с оспой овец и коз с применением средств специфической профилактики. Разработаны методики по выявлению антител к вирусу оспы в сыворотке крови овец в непрямом варианте иммуноферментного анализа и по выявлению и идентификации вируса оспы овец в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа, временный регламент: набор для серологической диагностики оспы овец методами РДСК и РДП и набор для диагностики оспы овец методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Экономическая значимость полученных результатов. Разработанный вакцинный препарат из местного штамма имеет значительные преимущества, заключающиеся в высокой иммуногенности, экологической безопасности, ранним сроком наступления иммунитета. Следовательно, внедрение в ветеринарную практику рекомендуемой вакцины из местного штамма для профилактики оспы овец позволит обеспечить желаемый уровень защиты от заражения, снизится заболеваемость и падеж мелкого рогатого скота. От этого уменьшится расход средств на проведение организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. проанализирована эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике за 2008-2012 г.г.;
2. проведено сравнительное изучение серологических реакций (ИФА, РДП и РДСК) для исследования оспы овец;
3. выделен местный штамм "Күл" вируса оспы;
4. проведено культивирование выделенного вируса на различных культурах клеток;
5. изучены иммунобиологические свойства штамма "Күл" вируса оспы овец;
6. проведено испытание опытного образца сухой аттенуированной вакцины против оспы овец из штамма "Күл" на лабораторных животных и на овцах.

Личный вклад соискателя. Соискателем в очагах инфекции самостоятельно проведен сбор первичного материала по оспе овец. Изучены иммунобиологические свойства местного штамма "Күл". Самостоятельно проведена лабораторная диагностика оспы овец с применением серологических методов и анализ экспериментальных данных.

Выделение вируса оспы и изучение иммунобиологических свойств штамма "Күл" выполнены с участием сотрудников лаборатории вирусологии и биотехнологии КыргНИИВ и закрытого акционерного общества (ЗАО) «Алтын-Тамыр» под научным руководством д.в.н., член-корр. НАН КР, профессора Нургазиева Р.З.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета КНИИВ, на научных конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 единоличных, одна рекомендация. Получен патент на изобретение № 1357 от 29 апреля 2011 года.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, приложения и списка использованной литературы.

Материал диссертации иллюстрирован 25 таблицами, 23 рисунками. Библиографический указатель содержит 160 источников научной литературы (отечественных и зарубежных авторов). В приложении представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование актуальности темы исследований, необходимость разработки отечественной вакцины против оспы овец на базе местного штамма вируса оспы.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается характеристика биологических свойств вируса оспы, традиционных серологических методов диагностики и методов борьбы с оспой овец.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследования и методического подхода к выполнению исследований. Опытные образцы вакцины проверялись на животных научно-экспериментальной базы КыргНИИ ветеринарии.

Материалом для исследований служили сыворотка крови, патологический материал от больных животных, который отбирался в хозяйствах, неблагополучных по оспе.

В работе также использовались материалы государственной ветеринарной отчетности по заболеваемости овец оспой, результаты серологических, вирусологических и биологических исследований.

Подопытные животные: не вакцинированные против оспы 45 овец разного возраста массой 35-40 кг; 35 морских свинок массой 450-600 г и 9 белых мышей массой 18-20 г.

Реакцию длительного связывания комплемента ставили в присутствии комплемента, принцип ее заключается во взаимодействии между антителом и антигеном. Реакцию ставили согласно инструкции по применению набора.

Реакция диффузионной преципитации. Приготовление агара. Необходимым компонентом РДП является гелевая среда, приготовленная из

агара. Обычно используют 1-1,5- или 2%-ный раствор агара в физрастворе поваренной соли, содержащем 0,25% хлористого кальция и в качестве консерванта раствор мертиолята. Приготовленный агар хранят при комнатной температуре (18°C) или в холодильнике (4-6°C).

Иммуноферментный анализ проводили для выявления антител вируса оспы. Реакцию ставили согласно инструкции по применению набора.

Отбор проб крови от опытных животных. Пробы крови от овец отбирали из яремной вены. Сыворотки крови для исследований получали стандартным методом. При исследовании сывороток крови на наличие антител их инактивировали 30 мин. при температуре 56°C с целью удаления термолабильных ингибиторов.

Подготовка проб материалов к исследованию на наличие вируса оспы овец. Для исследования на наличие вируса в органах и тканях отбирали пробы из легкого, папулы, везикулы и др. Отобранные пробы органов и тканей исследовали на наличие вируса оспы овец сразу после взятия, а оставшуюся часть хранили при температуре -40°C в течение двух месяцев.

Культивирование вируса. Проводили подбор культуры клеток; получение вирусосодержащего материала; заражение клеток вирусосодержащим материалом; культивирование вируса в клетках; индикация вируса в культуре клеток; сбор культуральной жидкости и идентификация в ней вируса.

Статистический анализ материалов проводили по методу Стьюдента, а также методами, изложенными в руководстве Ашмарина И.П. с использованием таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике.

Анализ и мониторинг заболеваемости овец оспой в Кыргызской Республике, анализ материалов ветеринарной отчетности указывают на то, что в последние годы наблюдается достаточно нестабильная эпизоотическая ситуация. В 1996 -1998 годах на территории республики отмечены вспышки оспы овец. В результате оперативной специфической профилактики и поддержания желаемого уровня поствакцинального иммунитета отмечен спад числа очагов. До 2002 года республика была свободна от оспы овец. Впервые в Таласской области наблюдались очаги вспышки оспы среди овец, однако благодаря принятым ветеринарно-санитарным мерам удалось искоренить и не допустить дальнейшего распространения инфекции.

В 2006 году в Баткенской области были единичные случаи оспы овец, которые далее распространились в новые вспышки в Ошскую и Джалал-Абадскую области. В 2007-2008 года оспа овец была зарегистрирована в Кочкорском, в Джумгалском районе (Нарынская область), пастбища

которого граничат с южными регионами. Согласно данным Департамента госветеринарии в Нарынском, Кочкорском районах, по сравнению с 2008 годом отмечен рост заболевания овец оспой. Благодаря вовремя проведенной вакцинации ситуация по оспе стабилизировалась. Об этом свидетельствуют обследования овец, показавшие отсутствие каких-либо признаков на оспе.

В 2009 году оспа овец регистрировалась в Чуйской и Нарынской областях. Всего за прошедший год было отмечено 178 овец заболевших. Для неблагополучных пунктов разработаны планы мероприятий по оздоровлению животных. Благодаря принятым мерам все очаги, в которых зарегистрирована оспа овец, оздоровлены.

Одной из наиболее важных задач, стоящих перед ветеринарными специалистами, это быстрая, точная и несложная в постановке диагностика массовых болезней овец, вызываемых вирусами. Контроль напряженности иммунитета вакцинированных животных.

По неофициальным данным и по результатам наших исследований в 2011 году неблагополучные пункты по оспе наблюдались в Нарынской, Иссык-Кульской и Чуйской областях. На интенсивность эпизоотического процесса и территориальное распространение болезни влияет уровень пораженности животных, смертности и летальности, сезонная динамика заболевания животных, влияние природно-географических, хозяйственно-организационных и ветеринарно-санитарных факторов.

В Нарынской области в феврале 2011 года в селе Чет-Нура была зарегистрирована вспышка оспы овец. При обследовании было установлено, что причиной возникновения вспышки оспы овец явилась покупка 180 голов овец из разных районов Нарынской области, в том числе из неблагополучного Атбашинского района. Все купленные на скотном базаре овцы были привезены в село Чет-Нура и без обязательного карантина выпущены на пастбища вместе с другими неинфицированными отарами овцами. В результате заноса вируса в Атбашинском районе возник свежий очаг оспы. Наблюдались типичные клинические признаки оспы: отказ от корма, поднялась температура, на теле животных появилась сыпь, опухание век, сопровождающиеся истечениями из глаз и носа. Наблюдалось появление оспин, которые чаще всего высыпали в четкой форме на малошерстных участках головы, внутренней области конечностей, хвоста и вымени. Папулы имели серо-белый или желтоватый вид с плотными краями и красным ободком. Покрывающий их тонкий слой эпидермиса некротизировался и легко снимался. Истощенные и слабые овцы, а также ягнята погибали от сепсиса и истощения.

В 2012 году регистрировались единичные случаи оспы в Джалал-Абадской области (Токтогульский и Сузакский районы).

По официальным данным Департамента государственной ветеринарии в период 2002-2012 г.г. наибольшее количество очагов по оспе овец наблюдалось в Нарынской и Иссык-Кульской областях. Возможно, это

связано с тем, что по их территории проходит транзитная дорога в Китай и Казахстан (рис. 1), транспортировка овец и мясопродукции между странами.

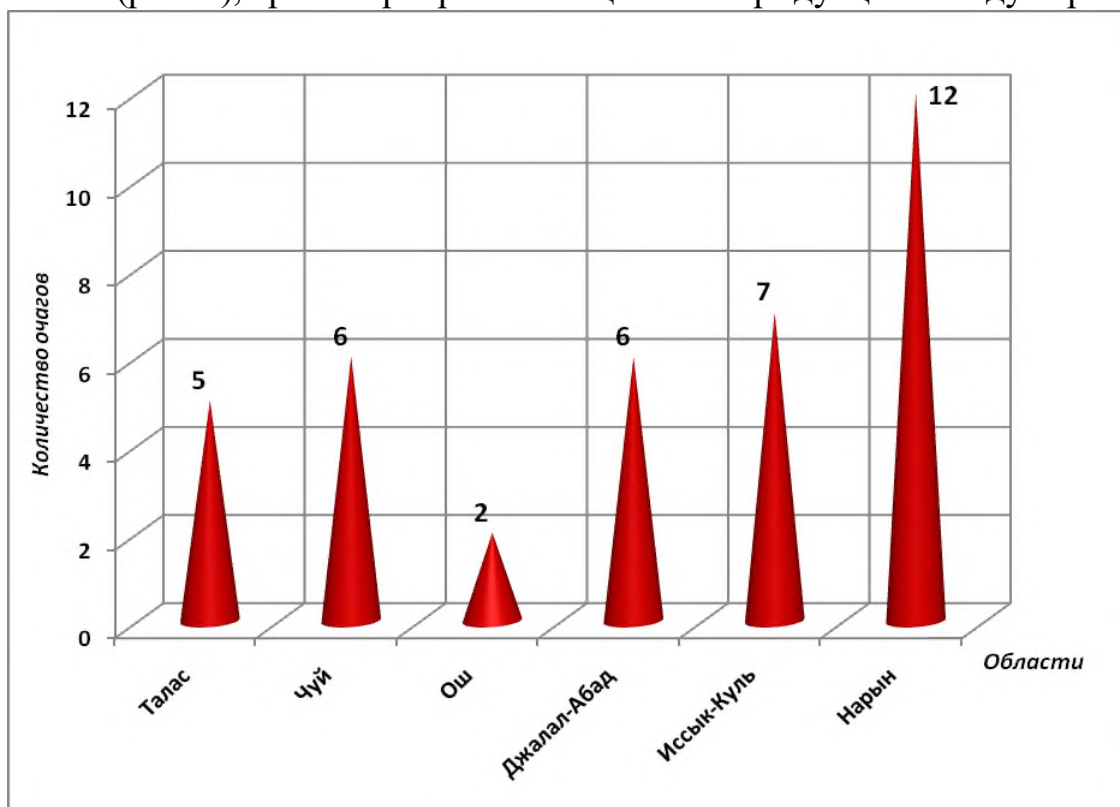


Рис. 1. Общее количество неблагополучных пунктов по оспе овец за 2002-2012 г.г.

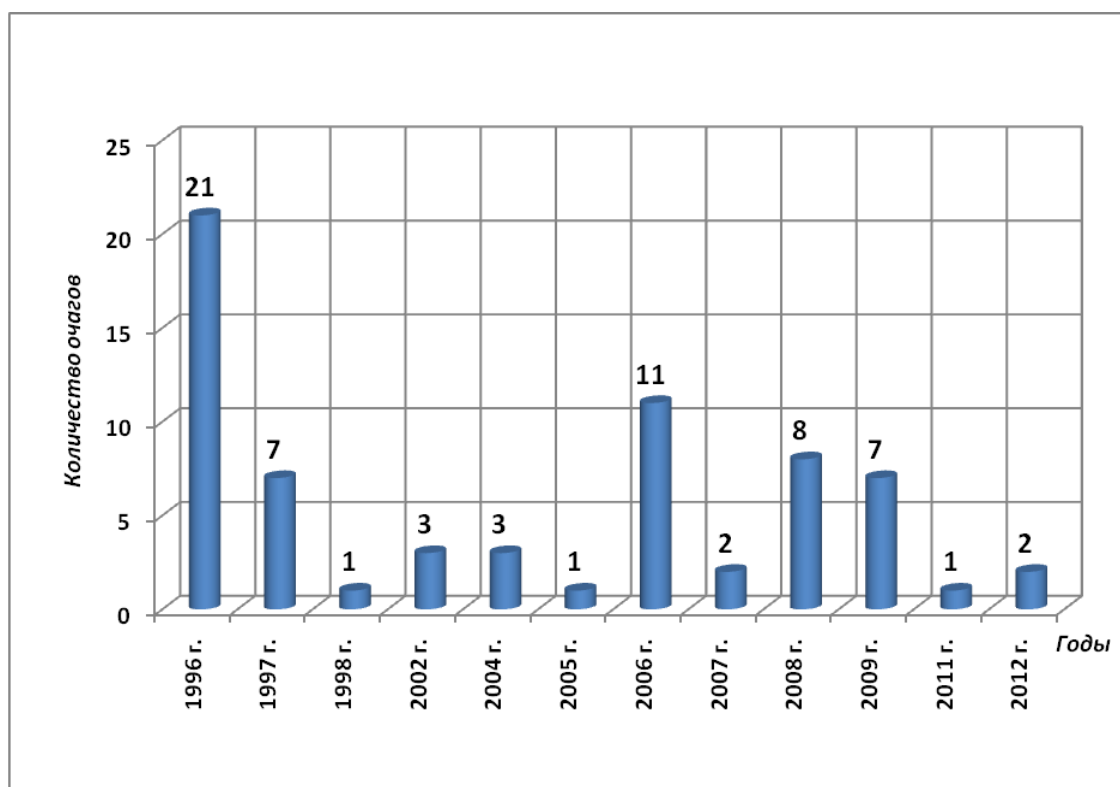


Рис. 2. Общее количество неблагополучных пунктов по оспе овец.

В 1996 году было зарегистрировано большое количество вспышек оспы овец в Джалал-Абадской, Чуйской и Нарынской областях, и возможно в результате проведения своевременной меры борьбы с ним, ситуация по оспе сохранялась достаточно стабильной, отмечались отдельные немногочисленные очаги. Также возможно, что после проведения своевременной эффективной специфической профилактики до 2002 года оспа овец не регистрировалась (рис. 2).

3.2. Изучение серологических реакций в сравнительном аспекте при исследовании вируса оспы овец.

Для изучения напряженности иммунитета у вакцинированных и больных овец и ягнят разных возрастных групп нами периодически проводился выборочный отбор сывороток крови. Для диагностики и проведения массовых эпизоотологических исследований мы проводили исследования с помощью нескольких серологических реакций ИФА, РДСК и РДП. Была взята сыворотка крови у 20 голов овец разного возраста.

Подтверждение диагноза на оспе считают при положительном результате несколькими лабораторными методами. При этом учитывается предварительный диагноз по клинико-эпизоотологическим и патологоанатомическим данным.

В настоящее время для диагностики оспы из серологических методов используются вместе современными и традиционные методы.

Постоянное наблюдение за иммунным фоном у овец в зонах систематической вакцинации является важным элементом противоэпизоотических мероприятий. Это позволяет оценить иммуногенную активность применяемых вакцин и своевременно прогнозировать возможное развитие эпизоотической ситуации.

Как видно из рис. 3, по результатам средних значений на 14-й день после вакцинации у овец разного возраста отмечены значительные титры антител в крови, что свидетельствует об устойчивом иммунитете. Следовательно, с применением ИФА, как более совершенного метода, выявлены титры антител в крови у овец и возрастная динамика, что свидетельствует об устойчивом иммунитете.

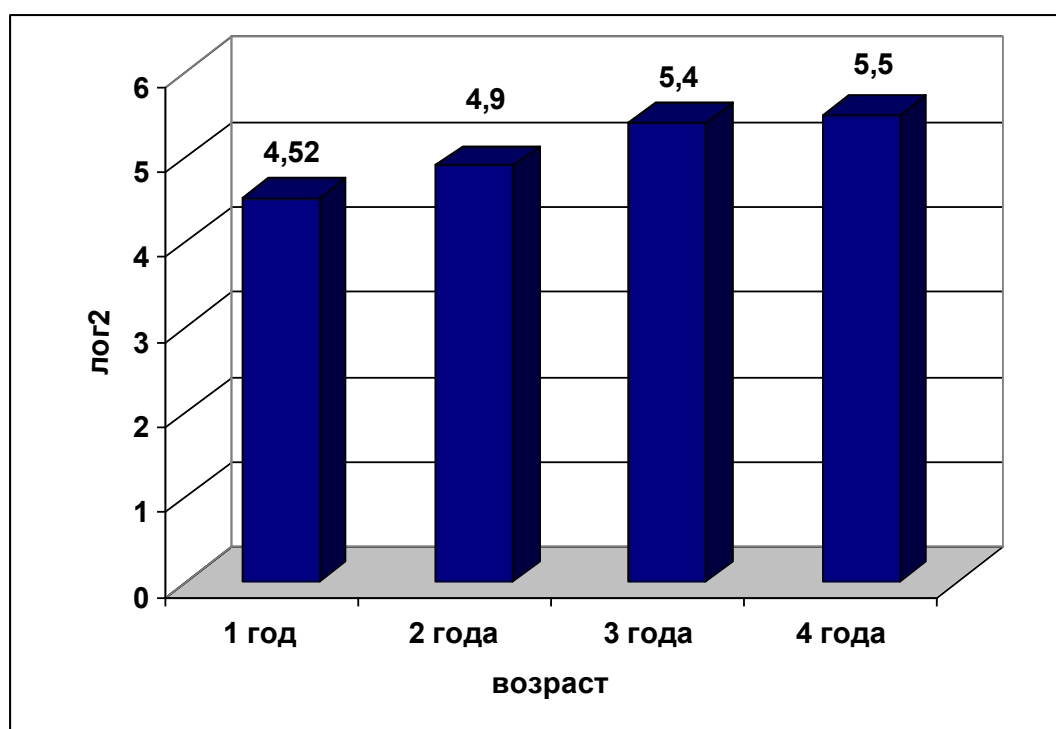


Рис. 3. – Титры антител в крови овец разного возраста через 14 дней после вакцинации

Нами определены титры антител в крови ягнят, которых вакцинировали Иорданской вакциной. Сыворотку крови отобрали у 40 ягнят, в частном хозяйстве Иссык-Кульской области на 14, 40, 50, 60 дни.

Таблица 1 – Титры антител в крови ягнят через 14-60 дней после вакцинации

| № | Дни после вакцинации | ИФА (лог ₂) | РДП | РДСК |
|---|----------------------|-------------------------|-----|------|
| 1 | 14 | 5,5±0,5 | 1:4 | 1:4 |
| 2 | 40 | 6,33±1,23 | 1:2 | 1:2 |
| 3 | 50 | 5,5±0,5 | 1:2 | 1:2 |
| 4 | 60 | 4,05±0,78 | 0 | 0 |

Примечания: 0 - сыворотка не активна.

Активность сыворотки проверяли на 14-й день после вакцинации, затем на 40, 50, 60 дни. Как видно в таблице 1 на 14-й день титр антител показывал 5,5±0,5 лог₂, и на 40-й день поднялся до 6,33±1,23 лог₂. Спустя 50 дней уже титр антител начал уменьшаться и на 60 день составил 4,05±0,78 лог₂. Это свидетельствует о хорошем иммунном фоне (табл.1.).

Через месяц, затем через полтора месяца после вакцинации исследовалась кровь у 30 баранов, 30 валухов и у 31 овцематки.

Таблица 2 – Титры антител в крови животных после вакцинации

| № группы | Кол-во голов | Вид | ИФА (лог ₂) | РДП | РДСК |
|----------|--------------|-----------|-------------------------|---------|---------|
| 1 | 30 | Бараны | 7,52±0,68 | 0 - 1:4 | 0 |
| 2 | 30 | Валухи | 6,97±0,97 | 0 - Ц | 0 - Ц |
| 3 | 31 | Овцематки | 5,35±0,93 | 0 - Ц | 0 - 1:4 |

Примечания: 0 - сыворотка не активна;

Ц – цельное

Результаты ИФА показали, активность титра антител в крови за период наблюдений составила у баранов - 7,52±0,68 лог₂, у валух - 6,97±0,97 лог₂ и у овцематок - 5,35±0,93 лог₂, в РДП и РДСК от цельного до 1:4. Следовательно, ИФА показал более достоверные данные наличия антител в крови вакцинированных овец (табл.2.).

Кроме того, мы проводили исследование сыворотки крови от больных животных. Исследование проводили тремя серологическими методами ИФА, РДП, РДСК.

Таблица 3 – Титры антител в крови больных оспой животных

| № группы | Вид | Кол-во голов | ИФА (лог ₂) | РДП | РДСК |
|----------|-------------------|--------------|-------------------------|----------|-----------|
| 1 | Бараны | 12 | 10,13±0,66 | Ц - 1:64 | 1:30-1:80 |
| 2 | Овцематки | 20 | 10,17±0,81 | Ц - 1:16 | 1:20-1:60 |
| 3 | Ярки | 14 | 7,35±0,85 | Ц - 1:32 | 1:20-1:60 |
| 4 | Ягнята 1,5-2 мес. | 15 | 9,5±0,8 | н/и | н/и |

Примечания: н/и – исследования не проводили;

Ц – цельное

В РДП и РДСК титры антител были в пределах Ц-1:64 и 1:20-1:80. В ИФА титры антител в крови больных животных были значительно выше, чем у вакцинированных. У больных ягнят титр антител был 9,5±0,8 лог₂, у баранов 10,13±0,66 лог₂, у овцематок 10,17±0,81.лог₂ (табл.3).

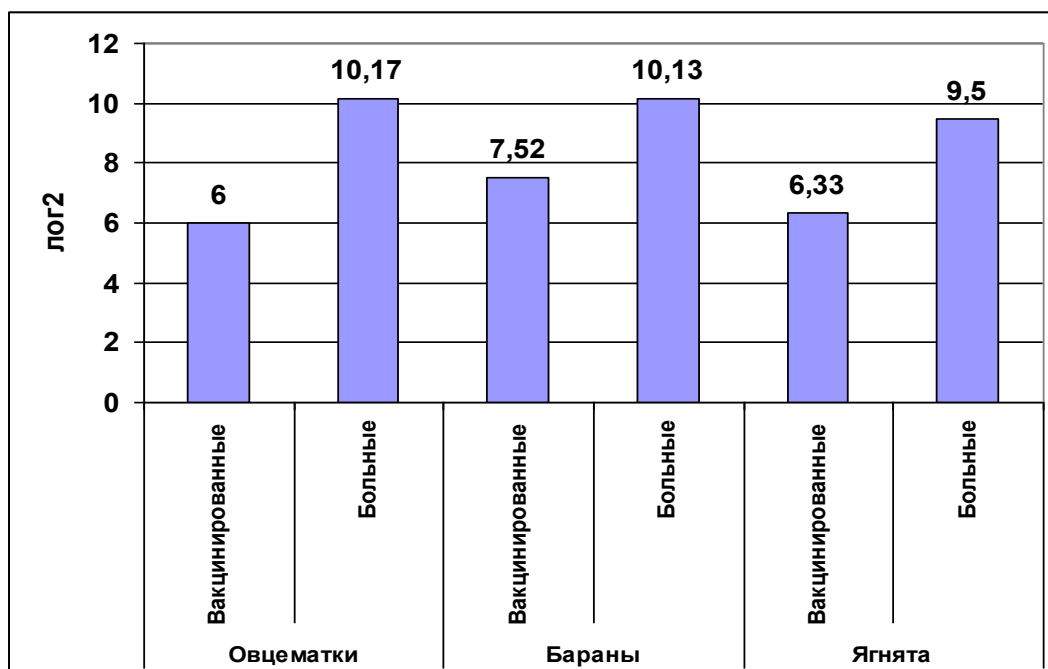


Рис. 4. –Титров антител в крови вакцинированных и больных животных

Как показали многочисленные исследования, для повседневного анализа образцов сыворотки на наличие специфических антител метод ИФА по сравнению с РДП, РДСК наиболее удобен и легко воспроизводим, требует меньше времени для постановки, экономичен в плане использования компонентов.

Таким образом, на сегодня ИФА является наиболее перспективным методом исследования сывороток крови животных и молока при проведении массовых эпизоотологических обследований на вирусные болезни овец.

3.3. Выделение и адаптация вируса. Одним из важных этапов в технологии изготовления противовирусных вакцин является получение высокоактивного вирусосодержащего материала. Для получения выделения вируса использовали различный патологический материал, доставленный из Нарынской области. Отбирали пораженные участки кожи и внутренние органы, замораживали при температуре минус 40°C и ниже.

Выделение и адаптацию вируса оспы проводили на культурах клеток почки ягненка (ПЯ), тестикул ягненка (ТЯ) и почки сирийского хомячка (ВНК-21) методом пассирования.

Приготовленную вирусную суспензию из патологического материала вносили в матрасы с монослоем клеток. Покачивая, распределяли его равномерно по слою клеток. В таком виде вирус адсорбировали на поверхности клеток в течение 1 часа при температуре 37°C . Затем из матрасов удалили вирусосодержащий материал и внесли поддерживающую среду. Контролем служили два незараженных матраса, где вносилось только поддерживающая среда и инкубировали в стационарном состоянии при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$.

Зараженную культуру клеток ежедневно просматривали под микроскопом в течение 7-12 дней. Вирусы, размножаясь в культуре клеток, вызывают дегенерацию клеток, т.е. оказывают цитопатическое действие (ЦПД). По истечению данного срока замораживали матрасы, где ЦПД составляло 70-90% всего монослоя. Последующие пассажи проводили аналогичным образом. Наличие вируса в культурах проверяли по проявлению цитопатического действия и тестированием в РСК. Проводили ежедневно цитоморфологические наблюдения. После микроскопирования питательную среду в зараженной культуре клеток не меняли.

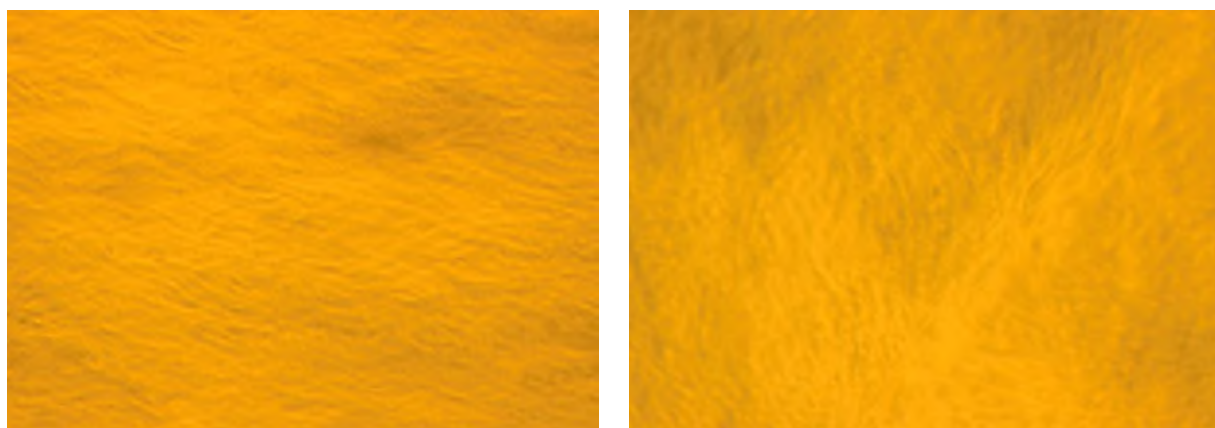


Рис. 5. Не зараженная культура клеток

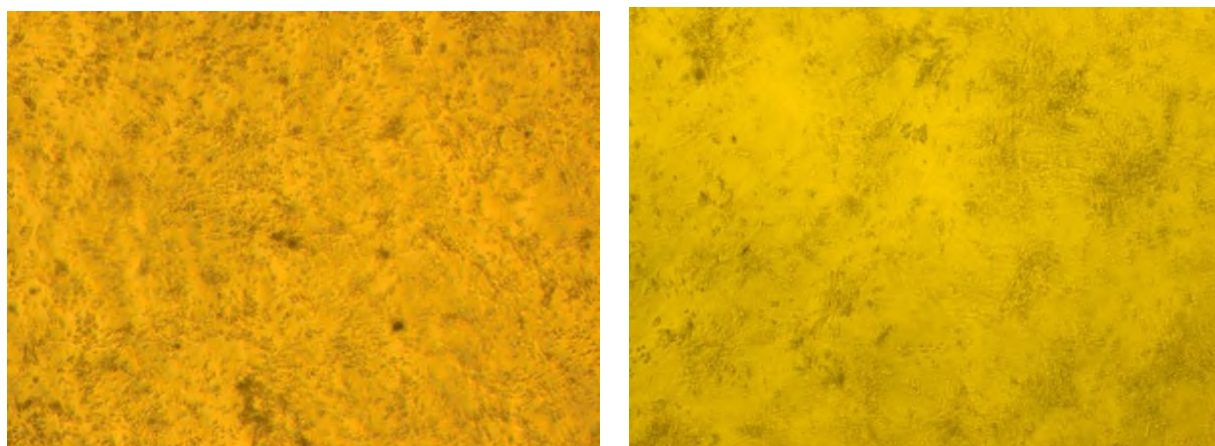


Рис. 6. Культура клеток, зараженная вирусом оспы овец

Цитопатическое действие вируса четко не проявлялось на 1 пассаже ни в одной из испытанных культур клеток. Начиная со второго пассажа, в культуре клеток ПЯ вирус проявлял цитопатическое действие, до шестого пассажа вирус размножался с развитием ярко выраженного ЦПД. Штамм вируса оспы овец считается адаптированным, если в однослойных культурах

клеток видно четко выраженное ЦПД. Способность вируса оспы размножаться наиболее высоко проявлялось в культуре клеток ПЯ.

Таблица 4 – Культивирование вируса оспы на культуре клеток ПЯ

| Пассаж | Продолжительность ЦПД (час.) | Активность в РСК | Титр инфекционности lg ТЦД ₅₀ /мл |
|--------|------------------------------|------------------|--|
| 1 | 144 | 1:8 | нн |
| 2 | 144 | 1:8 | 3,75 |
| 3 | 132 | 1:16 | 4,25 |
| 4 | 132 | 1:16 | 4,75 |
| 5 | 120 | 1:16 | 5,75 |
| 6 | 96 | 1:32 | 6,75 |
| 7 | 96 | 1:32 | 6,75 |
| 8 | 96 | 1:32 | 6,75 |

нн – не наблюдалось

Ежедневно проводили цитоморфологические наблюдения, брали пробы на титрование. Чтобы определить титр вируса 3 пассажа на ПЯ, проведено заражение культуры клеток ПЯ десятикратными разведениями культуральной жидкости из 3 пассажа. Титр инфекционности вируса в культуре клеток ПЯ составил 4,25 lg ТЦД₅₀/мл.

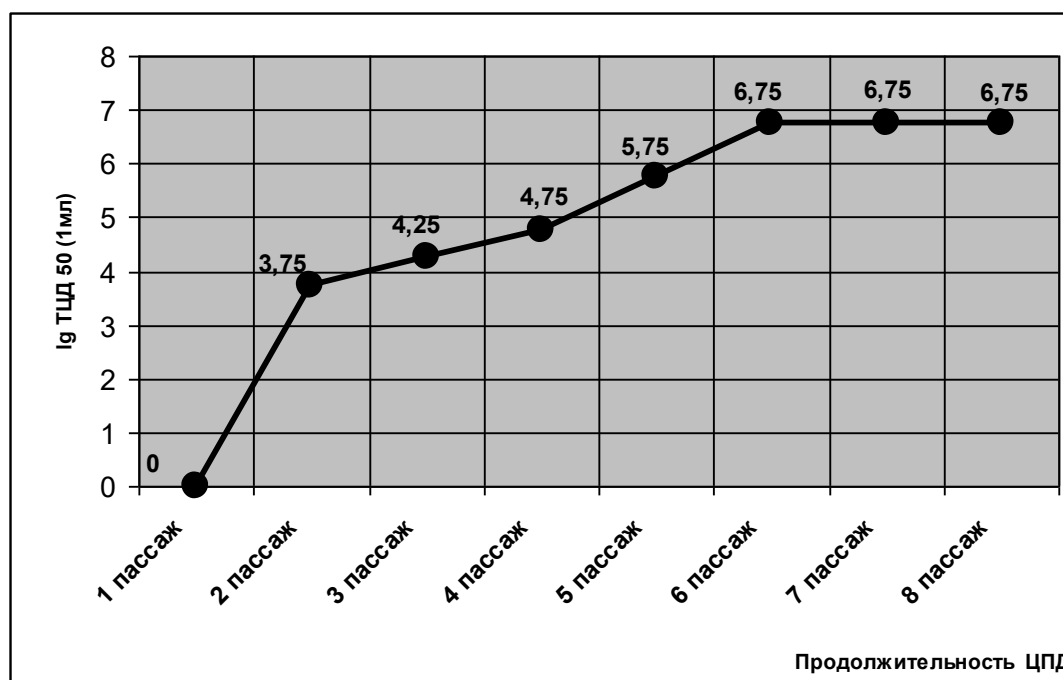


Рис. 7 – Динамика накопления вируса оспы в культуре клеток ПЯ.

Как видно из приведенной диаграммы, титр цитопатического действия вируса оспы на культуре клеток ПЯ постепенно увеличивался, от второго к

шестому пассажу с 3,75 до 6,75 lg ТЦД₅₀/мл. Но оставался на том же уровне в восьмом пассаже. Время цитопатического действия уменьшалось от второго к шестому пассажу со 144 до 96 часов, далее оставалось на том же уровне. Комплементсвязывающая активность в РСК составила 1:8 – 1:32 (табл. 4).

В ходе многочисленных экспериментов был выделен и адаптирован штамм вируса оспы овец на культуре клеток ПЯ, который назван "Кул" и стабильно нарабатывался в высоких титрах.

Технологический процесс приготовления вакцины. Для приготовления опытной серии вакцины на базе местного штамма использовали расплодку, приготовленную из матриксной серии. В матрасы с культурой клеток емкостью 1,5 дм³ вносили разведенной поддерживающей средой по (200±20) см³ вирусной суспензии, (доза заражения 0,05-0,06 ТЦД на клетку). Инфицированные матрасы культивировали в стационарном состоянии при температуре (37±0,5)⁰С. Срок культивирования вируса составил 3-4 сут. без смены среды. Оставляли незараженные матрасы для контроля, которые поддерживали в одинаковых условиях с инфицированными. Начиная со 2 суток инкубирования, ежедневно проводили микроскопию.

Через 5-10 суток в матрасах наблюдались цитопатические изменения на 70-90% поверхности клеточного монослоя. Из каждого матраса отбирали пробы и делали высевы на стерильность. Затем замораживали при минус (40±1)⁰С и сохраняли при этой температуре до получения результатов стерильности.

Для контроля оставляли незараженными 3 маленьких матраса с культурой клеток. Два раза в день проводили микроскопию зараженных и незараженных матрасов. В зараженных матрасах наблюдали округления, изменения морфологии клеток, то есть выраженное цитопатическое действие. В незараженных матрасах культура клеток не изменялась, то есть сохраняла нормальную структуру.

На следующие сутки, замороженные субкультуры оттаивали при комнатной температуре. Из каждого сосуда брали пробы в количестве по 5 см³ для проверки на бактериальное загрязнение и активность вируса. Полученную вирусную суспензию сливали в одну емкость. К вирусосодержащей культуральной жидкости добавляли защитную среду – стабилизирующий раствор триголаза, охлажденный до (4±1)⁰С в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД, стрептомицин 500 мг на 1 дм³ смеси. Содержимое сосуда тщательно перемешивали. Смесь разливали специальными дозирующими шприцами-автоматами по 2 см³ в стерильные флаконы (ГОСТ 64-2-485) и подвергали лиофилизации на специальных установках.

Сушку проводили в сублимационной установке. Процесс сушки идет при температуре конденсатора от -64⁰С до +40⁰С в течение 2 суток. Далее флаконы укупоривали под вакуумом с помощью прижимных плит. По

окончанию сушки в вакцину спускали через фильтр стерильный воздух, затем переносили в бокс и в стерильных условиях закрывали резиновыми пробками, вакуумировали и упаковывали алюминиевыми колпачками. На флаконы наклевали этикетку и отправляли в упаковку.

4. Испытание опытной серии сухой аттенуированной вакцины.

Серией вакцины считается определенное количество препарата, однородное по физическим и иммунобиологическим показателям, полученное при одном режиме культивирования.

Определение внешнего вида осуществляется визуально. Брали 3 опытных образца (K^1 , K^2 и K^3) вакцины и визуально проводили наблюдение на наличие посторонней примеси. Образцы были целыми, без трещин и имели одинаковый объем содержимого в виде рыхлых таблеток желтовато-серого цвета, без посторонней примеси.

Определение вакуума. Вакуум в ампулах с опытными образцами вакцины определяли по ГОСТ 28083-89. Ампулы без вакуума подлежат выбраковке.

Определение растворимости

Растворимость вакцины определяли путем добавления в опытные образцы по 2 см^3 стерильного физиологического раствора. Содержимое в каждом образце растворяли в течение 90 с при температуре от 18°C до 22°C и представляли собой гомогенную взвесь без осадка.

Определение влажности

Влажность вакцины осуществляли по ГОСТ 24061-80. Она находилась в пределах 2-4%.

Стерильность вакцины проверяли по ГОСТ 28085-89. Брали 3 опытных образца вакцины (K^1 , K^2 и K^3), в каждый внесли стерильную поддерживающую среду в объеме, равном объему до высушивания вакцины (2 см^3). После растворения содержимого каждого образца стерильными пипетками делали посева по 2 пробирки со средой МПА, МПБ, МППБ и Сабуро. По 2 пробирки со средой МПА, МПБ, МППБ, помещали в термостат при температуре $36-37^\circ\text{C}$, и 2 пробирки со средой Сабуро оставляли при температуре $24-26^\circ\text{C}$. Ввели наблюдение за ними в течение 10 дней.

В посевах в течение 10 дней роста грибковой и бактериальной микрофлоры не наблюдалось, следовательно, вакцина является стерильной.

Биологическую активность вакцины определяли титрованием в культуре клеток почки ягнят (ПЯ). На поддерживающей среде готовили десятикратные разведения, от 10^{-1} до 10^{-7} из полученной смеси. В 7 пробирок вносили по $4,5\text{ см}^3$ поддерживающей среды. В первую пробирку внесли $0,5\text{ см}^3$ вакцины. Чистой пипеткой смешивали содержимое первой пробирки и $0,5\text{ см}^3$ переносили во вторую пробирку. Последующие разведения готовили таким же методом. Разведенной суспензией вакцины, начиная с 10^{-7} , заражали по 4 пробирки с культурой клеток в объеме 1 см^3 суспензии. Для контроля брали 4 пробирки с обычной культурой клеток.

Зараженные и контрольные пробирки с культурой клеток инкубировали в стационарном положении при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Смену среды проводили через каждые 3 суток.

Таблица 5 – Титрование вирусосодержащей суспензии вируса оспы

| Наименование вирусного материала | Разведения вируса, учет ЦПД в каждой пробирке | | | | | | | Титр в \lg ТЦД _{50/см³} |
|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|
| | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | |
| Вирусосодержащая суспензия штамма "Кул" | + | + | + | + | + | + | - | 5,5 |
| | + | + | + | + | + | - | - | |
| | + | + | + | + | + | - | - | |
| | + | + | + | + | - | - | - | |

Учет результатов титрования проводили на 12 сутки, при отсутствии цитопатических изменений в контрольных пробирках и по наличию цитопатических изменений в зараженных пробирках.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. Титр инфекционности вирусосодержащей суспензии штамма "Кул" составил $5,5 \lg$ ТЦД_{50/см³, что свидетельствует об инфекционности суспензии.}

Изучение безвредности вакцины на лабораторных животных

Приготовленные вакцины обязательно проверяются на безвредность. Для этого использовали 15 белых мышей и 9 морских свинок. Для испытания взяли 3 опытных образца вакцины. Стерильного физиологического раствора вносили по 2 см^3 в каждую ампулу.

Вакцину вводили подкожно морским свинкам в бесшерстный участок подмышечной области в объеме $0,5 \text{ см}^3$ и белым мышам по $0,1 \text{ см}^3$. За лабораторными животными наблюдали в течение 10 суток.

У всех наблюдаемых животных на месте введения вакцины не отмечено появление отека, болезненности, местного повышения температуры тела, общее физиологическое состояние было в пределах нормы. Следовательно, опытные образцы вакцины были безвредными.

Определение иммуногенной активности вакцины

Для испытания взяли 3 опытных образца вакцины. Вносили стерильный физиологический раствор по 2 см^3 в каждую ампулу. Содержимое всех ампул после растворения перенесли в стерильный стеклянный флакон емкостью 200 см^3 и тщательно смешивали. Из полученной смеси на стерильном физиологическом растворе готовили разведение 1:25, 1:50, 1:100. Для определения иммуногенной активности использовали 20 морских свинок. На каждое разведение вакцины и контроля взяли по 5 морских свинок. Каждую группу держали в отдельном барьере, на котором закрепляли этикетку с указанием даты начала испытания, разведение вакцины.

Вакцину 3 группам морских свинок вводили по 0,1 см³ подкожно в бесшерстный участок подмышечной области в разведении 1:25, 1:50, 1:100. В течение 12 суток вели визуальное наблюдение за животными. Через 12 суток после вакцинации опытных морских свинок и 5 контрольных заражали внутрикожно вирулентным штаммом вируса оспы в дозе 500-1000 ИД₅₀ по 0,2 см³ на бесшерстной части задней лапки. В течение 14 суток у экспериментальных морских свинок проводили клинический осмотр и измеряли температуру тела.

Таблица 6 – Иммуногенная активность вакцинированных и контрольных животных

| Количество голов и вид животных | | Разведение вакцины по 0,1 см ³ | Доза заражения | Результаты наблюдения | |
|---------------------------------|---|---|---------------------|-----------------------|-----------------|
| | | | | гипертермия | местная реакция |
| Вакцинированные | 5 | 1:25 | 0,2 см ³ | нет | нет |
| | 5 | 1:50 | 0,2 см ³ | нет | нет |
| | 5 | 1:100 | 0,2 см ³ | нет | нет |
| Контрольные | 5 | - | 0,2 см ³ | 41,5-42,0 °С | 1,7-2,0 см |

У всех 15 привитых морских свинок не наблюдалось реакции в месте введения вирулентного вируса и температурной реакции. Контрольная группа морских свинок заболела с обычными клиническими признаками: общая температура тела 41,5-42,0 °С папулы, переходящие в везикулы и пустулы в месте введения вирусной суспензии размером 1,7-2,0 см в диаметре.

4.1. Сравнительное испытание опытной серии вакцины с коммерческой вакциной.

По причине недостаточного охвата профилактическими прививками овец против оспы и отсутствия иммунитета у части животных эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике остается напряженной. Для вакцинации овец в республике использовались вакцины местного, Иорданского и Российского производства, но наиболее высокий эффект достигает от вакцины местного производства, приготовленной из местного штамма.

Способность средств специфической профилактики создавать длительную невосприимчивость вакцинированных животных к заражению является одной из важнейших характеристик биопрепаратов. С целью определения поствакцинального иммунитета проводили испытание сухой аттенуированной вакцины из штамма "Кул" на 5 овцах в возрасте 32-36 мес. Для сравнения 5 овец вакцинировали коммерческой вакциной. Вакцины овцам вводили подкожно в бесшерстный участок подмышечной области в дозе 1 см³.

Отбор сывороток крови у 10 овец проводили на 0, 7, 14, 21 день, затем через месяц и через 1,5 месяца после вакцинации. Вакцинацию проводили один раз. Титр антител определяли с помощью серологических реакций ИФА, РСК, и РДП.

Таблица 7 – Напряженность иммунитета у вакцинированных овец (по данным ИФА)

| Примененная вакцина | № п/п овец | На 0 день | Через 7 дней | Через 14 дней | Через 21 день | Через 1 мес. | Через 1,5 мес. |
|---------------------------------------|------------|-----------|--------------|---------------|---------------|--------------|----------------|
| Опытная серия вакцины из штамма «Күл» | 1 | 1:2 | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| | 2 | 1:2 | 1:8 | 1:16 | | | |
| | 3 | - | 1:8 | 1:16 | | | |
| | 4 | 1:2 | 1:16 | 1:32 | | | |
| | 5 | 1:2 | 1:16 | 1:32 | | | |
| Вакцина коммерческая | 1 | 1:2 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| | 2 | - | 1:4 | 1:8 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| | 3 | 1:2 | 1:8 | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| | 4 | 1:2 | 1:4 | 1:32 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| | 5 | - | 1:4 | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 |

У овец, вакцинированных вакциной из местного штамма, на 7 день после вакцинации титр антител составил 1:8 – 1:16, и в последующем он поднялся до 1:128. Этот титр держался до 5-6 месяцев. Это свидетельствует, что вакцина из местного штамма "Күл" даёт желаемый уровень титра антител. У овец, вакцинированных коммерческой вакциной, титр антител возрастал медленней.

По результатам лабораторных исследований вакцина против оспы овец из местного штамма "Күл" является безвредной, неактогенной, иммуногена, вырабатывается высокий уровень специфических антител и при заражении контрольных вакцинированных овец защищает от заболевания.

ВЫВОДЫ

1. За последние 10 лет эпизоотическая ситуация в республике по оспе овец остается не стабильной, ежегодно в регионах разведения овец регистрируются оспенные очаги с разной степенью поражения животных. Особенно часто оспа овец встречается в Нарынской и Джалал-Абадской областях.

2. При сравнении методов ИФА с РДСК и РДП установлено, что полученные показатели коэффициента корреляции в серологических реакциях указали достаточно высокий уровень значимости ($p \leq 0,05$) и при этом выявлено, что наиболее тесная связь ИФА установлена для РДСК $r_{ИФА и РДСК} = 0,822$. Значения коэффициента ИФА и РДП указывает на менее выраженную связь $r_{ИФА и РДП} = 0,733$.

3. Выделен и адаптирован новый штамм "Күл" вируса оспы, изучено его соответствие производственным штаммам. Штамм использован в конструировании в опытных образцах отечественной противооспенной вакцины.

4. Оптимизировано время культивирования вируса оспы на культуре клеток ПЯ, которое составило 96 часов; получен стабильный титр инфекционности вируса в пределах $6,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ с комплементсвязывающей активностью 1:32.

5. Штамм "Күл" вируса оспы овец обладает высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью с титром $10^{5.5} \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

6. Преимуществом сухой аттенуированной вакцины против оспы овец является высокая иммуногенность и экологическая безопасность. Она позволяет обеспечить высокий поствакцинальный иммунитет против указанной инфекции до 98%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются:

- рекомендации по борьбе с оспой овец и коз;
- методика по выявлению антител к вирусу оспы в сыворотке крови овец в непрямом варианте иммуноферментного анализа;
- методические указания по выявлению и идентификации вируса оспы овец в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа;
- временный регламент, набор для серологической диагностики оспы овец методами РДСК и РДП;
- временный регламент, набор для диагностики оспы овец методом иммуноферментного анализа (ИФА);
- ветеринарной практике и биологической промышленности республики рекомендован местный штамм "Күл" вируса оспы овец для

изготовления противооспенных средств специфической профилактики (вакцины).

- получен патент «Сухая аттенуированная вакцина против оспы овец из штамма "Күл"», №1357 от 29 апреля 2011 года.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мамытова А.Т. Совершенствование метода ПЦР по диагностике оспы овец и коз [Текст] / Р.З.Нургазиев, Н.Т. Джапаралиев, А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского Национального Университета им. Ж. Баласагына, Бишкек, 2008. – С. 117-119.
2. Мамытова А.Т. Сравнительная характеристика серологических реакций для исследования оспы овец [Текст] / Н.Т. Джапаралиев, Э.К. Акматова, А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбища имени А. Дуйшеева. №3. Бишкек, 2008. – С. 118-121.
3. Мамытова А.Т. Эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике [Текст] / Р.З. Нургазиев, Ж.Ч. Орозов, А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбища имени А. Дуйшеева. № 1. Бишкек, 2009. – С. 152-154.
4. Мамытова А.Т. Вопросы диагностики и профилактики оспы овец и коз [Текст] / Р.З. Нургазиев, Ж.Ч. Орозов, Н.Т., Джапаралиев, А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбища имени А. Дуйшеева. № 1. Бишкек, 2009. – С. 148-151
5. Мамытова А.Т. Биологическая активность разработанных вакцин [Текст] / Н.Т., Джапаралиев, Р.З. Нургазиев, К.К. Мусуралиев, Т.Т. Кожоналиев, А.Т. Мамытова // Гигиена, эпидемиология и иммунология. №4. Алматы, 2009. – С. 155-158.
6. Мамытова А.Т. Разработка метода ПЦР для выявления оспы овец и коз [Текст] / Н.Т., Джапаралиев, Р.З. Нургазиев, К.К. Мусуралиев, Т.Т. Кожоналиев, А.Т. Мамытова // Вестник Казахского Аграрного Университета им С.Сейфуллина. Серия сельскохозяйственных, ветеринарных и биологических наук. №4. Алматы, 2009. – С. 202-207.
7. Мамытова А.Т. Рутинные и современные методы диагностики оспы животных [Текст] / А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева и Кыргызского научно-исследовательского института животноводства и пастбища. Бишкек, 2011. – С. 196-199.

8. Мамытова А.Т. Культивирование штамма вируса оспы овец [Текст] / А.Т. Мамытова // Сборник научных трудов Казахского НИВИ, посвящ.20-летию Независимости Казахстана. Алматы, 2011. –С.199-202.
9. Мамытова А.Т. Вакцинапрофилактика овец против оспы [Текст] / А.Т. Мамытова // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева и Кыргызского научно-исследовательского института животноводства и пастбища. Бишкек, 2012. №7. – С. 220-222.

Мамытова Айгуль Табалдыевнанын «Күл ылаңынын серологиялык диагностикасы жана жергиликтүү штаммынан даярдалган вакциналык препаратты иштеп чыгаруу» темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: күл, вакцина, изолят, адаптация, пассаж, мониторинг, антители, реактогендүүлүк, иммуногендүүлүк.

Изилдөөнүн объектиси: ылаңдаган малдар, патологиялык материал, малдардын канынын сары суусу, күл вирусунун штаммы, вакцина.

Иштин максаты: Кыргыз Республикасынын территориясында бөлүнгөн күл вирусунун "Күл" штаммынын иммунобиологиялык касиетин изилдөө жана бул штамм аркылуу тажрыйба сериясын атайын алдын алуу каражатын түзүү

Изилдөөнүн ыкмалары: эпизоотологиялык мониторинг, серологиялык, молекулярдык-биологиялык, вирусологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: Кыргыз Республикасында биринчи жолу күл ылаңынын вирусунун, "Күл" штаммы бөлүп алынган. 2009-жылы Кыргызстанда бөлүнүп алынган күл ылаңынын вирусунун штаммынын биологиялык касиеттери изилденген. Бөлүнүп алынган штаммдан күл ылаңына каршы кургак аттенуацияланган вакцина даярдалган. Бул вакцинаны лаборатордук жана койлордо текшергенде, өзүнүн антигендик жана иммуногендик активдүүлүгү жогору экендиги далилденген.

Алынган жыйынтыктар 2011-жылдын 29-апрелиндеги № 1357 патент менен тастыкталган.

Колдонуу чөйрөсү: эпизоотологиялык, вирусологиялык жана ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации Мамытовой Айгуль Табалдыевны на тему «**Серологическая диагностика оспы овец и разработка вакцинного препарата из местного штамма**» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: оспа овец, мониторинг, изолят, адаптация, пассаж, вакцина, реактогенность, иммуногенность, антитело.

Объект исследования: восприимчивые животные, патологический материал, сыворотка крови животных, штамм вируса оспы, вакцина.

Цель работы: изучить иммунобиологические свойства штамма "Күл" вируса оспы, выделенного на территории Кыргызской Республики, изготовить опытную серию вакцинного препарата на базе данного местного штамма.

Методы исследования: эпизоотологический мониторинг, серологический, молекулярно-биологический, вирусологический.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Кыргызской Республике получен местный специфический штамм вируса оспы. Изучены иммунобиологические свойства вируса оспы овец из штамма "Күл". Изготовлена опытная серия сухой аттенуированной вакцины против оспы овец из штамма "Күл", которая при испытании на лабораторных животных и овцах показала высокую антигенную и иммуногенную активность.

Новизна полученных результатов подтверждена патентом № 1357 от 29 апреля 2011 года.

Область применения: эпизоотология, вирусология и ветеринарная практика.

RESUME

Mamytova Aigul Tabaldyevna
dissertation on a theme «**Serological diagnostics of sheep pox and working vaccine preparation from local strain**» on competition of a scientific degree of the candidate of biology sciences on a speciality 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootology, micology with micotoxicology and immunology

Keywords: sheep pox, monitoring, isolate, adaptation, passage, vaccine, reactancegenic, immunogenic, antibody.

Object of research: susceptible animals, pathological material, whey of serum of animals, strain of sheep pox virus, vaccine.

The work purpose: study the immunobiological properties of the strain "Kul" sheep pox virus isolated in the territory of the Kyrgyz Republic, and make a series of experimental vaccine preparation on the basis of the local strain.

Research methods: epizootological monitoring, serological, molecular-biological, virological

The received results and their novelty: For the first time in the Kyrgyz Republic has received local specific strain of the sheep pox virus. Studied immunobiological properties of sheep pox virus strain "Kul". A pilot series of dry, attenuated vaccine strain of sheep pox "Kul", which, when tested on laboratory animals and sheep showed high antigenic and immunogenic activity. The novelty of the results confirmed by the patent number 1357 of 29 April 2011.

Scope: epizootology, virology and veterinary practice.