**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

Авторефератдиссертации

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 хозяйствах 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.

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 Джумгальском 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 районе Нарынской области и Тонском районе Иссык-Кульской области, а также на скотном рынке г.Токмок 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 Нургазиева Р.З., Иманова Э.Д., Джапаралиева Н.Т., Жунушева А.Т., Белекова Т.Б.

Одним из важных моментов в борьбе с оспой животных является быстрая и точная диагностика возникшего 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 и расшифровка этиологии заболеваемости 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. 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 противооспенных 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, значительно сократит заболеваемость и падеж мелкого рогатого скота. При этом снизится 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 23 таблицами, 21 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 и подготовки для этого производственного штамма вируса.

**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 10 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°С) или в холодильнике (4-6°С).

*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 56С 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 -40С в течение двух месяцев.

*Культивирование вируса*. Проводили подбор культуры клеток; получение вируссодержащего материала; заражение клеток вируссодержащим 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 профилактике и поддержания желаемого уровня поствакцинального иммунитете 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.

Новые вспышки оспы овец зарегистрированы в 2006 году в Баткенской области, которая далее распространилась на Ошскую и Джалал-Абадскую области. В 2007-2008 года оспа овец была зарегистрирована в Джумгальском районе (Нарынская область), пастбища которого граничат с южными регионами. Согласно данным Департамента госветеринарии в Нарынском районе по сравнению с 2008 годом отмечен рост заболевания овец оспой. Вместе с тем в Кочкорском районе, благодаря вовремя проведенной вакцинации ситуация по оспе стабилизировалась. Об этом свидетельствуют обследования овец, показавшие отсутствие каких-либо признаков на оспу.

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.

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.

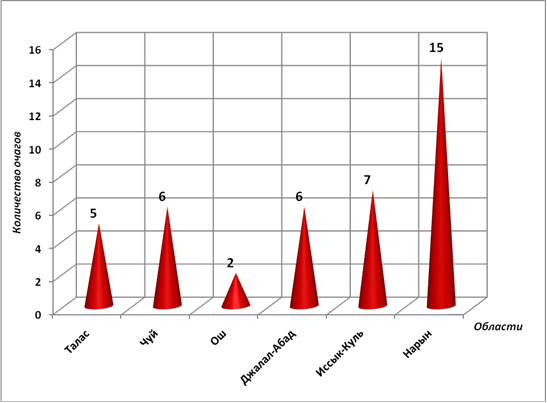


Рис. 1. Общее количество неблагополучных пунктов по оспе овец

за 2002-2012 г.г.

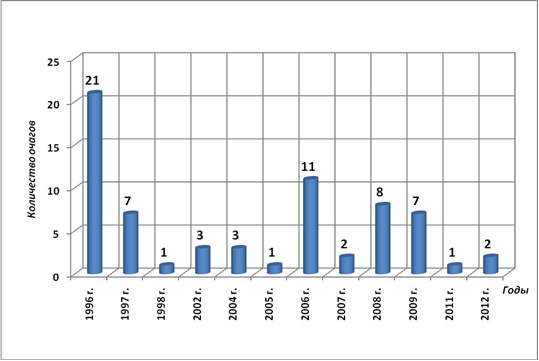


Рис. 2. Общее количество неблагополучных пунктов по оспе овец.

1996 год был наиболее неблагополучным по оспе овец для Джалал-Абадской, Чуйской и Нарынской областей по официальным данным Департамента государственной ветеринарии. В последующие годы ситуация по оспе сохранялось достаточно стабильной, отмечались отдельные немногочисленные очаги (рис. 2).

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

Диагноз на оспу считают подтвержденным при получении положительного результата одним или несколькими лабораторными методами. При этом учитывается предварительный диагноз, по клинико-эпизоотологическим и патологоанатомическим данным.

Постоянное наблюдение за иммунным фоном у овец в зонах систематической вакцинации против оспы является важным элементом противоэпизоотических мероприятий. Это позволяет оценить иммуногенную активность применяемых вакцин и своевременно прогнозировать возможное развитие эпизоотической ситуации. Для изучения напряженности иммунитета у вакцинированных и больных овец и ягнят разных возрастных групп нами периодически проводился выборочный отбор сывороток крови. Для диагностики и массовых эпизоотологических исследований применялись серологические реакции ИФА, РДСК и РДП.

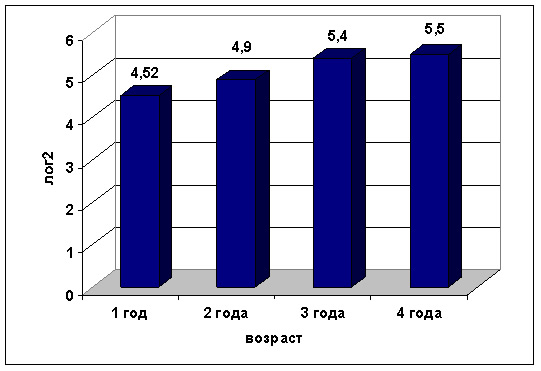


Рис. 3. –Титры антител в крови овец разного возраста через 14 дней после вакцинации

Как видно из рис. 3, где приведены данные титров антител в сыворотке крови из разных опытных групп. Установлен, уровень антител в крови животных зависит от возраста овец. Так, титры антител в ИФА у годовалых овец через 13-14 дней после вакцинации достигали значений 4.3+0.5 – 4.8+0.4 лог2. У овец в возрасте 2 года титр антител через 14 дней после вакцинации составлял 4.5+0.9 – 5.5+0.5 лог2. Среднее значение титр антител в крови у овец в возрасте 3 года показывал 5,4+0,4 лог2. У взрослых овец (4 года) он достигал 6,0+0,7 лог2. В РДП и РДСК антител в крови вакцинированных животных в указанные сроки не выявляли или они были в пределах 1:2 и 1:4 соответственно. Следовательно, с применением ИФА, как более совершенного метода, выявлены значительные титры антител в крови у овец, что свидетельствует об устойчивом иммунитете.

Нами определены титры антител в крови у ягнят, для чего были отобраны сыворотки крови у 40 вакцинированных ягнят.

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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Дни после вакцинации | ИФА (лог2) | 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. По нашим наблюдениям активность титра антител в крови держался до года (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 (лог2) | 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 РПД и РДСК от цельного до 1:4. Следовательно, ИФА показал более достоверные данные наличия антител в крови вакцинированных овец (табл.2.).

Нами исследована сыворотка крови от больных животных.

Таблица 3 – Титры антител в крови больных оспой животных

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № группы | Вид | Кол-во голов | ИФА (лог2) | 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

Титры антител в крови больных животных были значительно выше, чем у вакцинированных и составляли в ИФА 7,35+0,85-10,17+0,81лог2 (рис. 4.). Титры преципитирующих и комплементсвязывающих антителах были в пределах Ц-1:64 и 1:20-1:80 соответственно (табл.3).



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

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

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

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

**3.3. Выделение и адаптация вируса**. Одним из важных этапов в технологии изготовления противовирусных вакцин является получение высокоактивного вируссодержащего материала. Для получения выделения вируса использовали различный патологический материал доставленный из Нарынской области. Отбирали пораженные участки кожи и внутренние органы, замораживали при температуре минус 400С 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 37оС. Затем из матрасов удалили вируссодержащий материал и налили поддерживающую среду. Для контроля оставляли незараженными 2 матраса, в которые вносили только поддерживающую среду и инкубировали в стационарном положении при (37±0,5)оС.

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

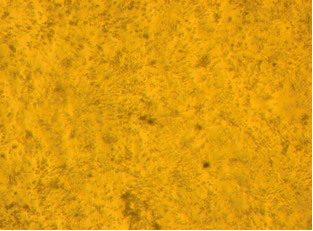
 

Рис. 6. Культура клеток, зараженная вирусом оспы овец

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 ТЦД50/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 на 3-м пассаже на ПЯ, проведено заражение культуры клеток ПЯ десятикратными разведениями культуральной жидкости из 3-го 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, установлено, что титр инфекционности вируса оспы на культуре клеток ПЯ постепенно увеличивался от второго к шестому пассажу с 3,75 до 6,75 lg ТЦД50/мл, оставался на том же уровне в восьмом пассаже. Время цитопатического действия уменьшалось от второго к шестому пассажу, от 144 до 96 часов, далее оставалось на том же уровне. Комплементсвязывающая активность в РСК составила 1:8 – 1:32 (табл. 4).

Таким образом, был выделен и адаптирован штамм вируса оспы овец на культуре клеток ПЯ, который назван «Күл» и стабильно нарабатывался в высоких титрах.

**4. Испытание опытной серии сухой аттенуированной вакцины.**

*4.1.Технологический процесс приготовления вакцины*. Для приготовления экспериментальной серии вакцины на базе местного штамма использовали расплодку, приготовленную из матриксной серии. В матрасы с культурой клеток емкостью 1,5 дм3 вносили по (200±20) см3 вирусной суспензии разведенной поддерживающей средой (доза заражения 0,05-0,06 ТЦД на клетку). Зараженные матрасы культивировали в стационарном положении 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 и делали высевы на стерильность. Затем замораживали при минус (40±1)0С и сохраняли при этой температуре до получения результатов контроля стерильности.

Контролем служили 3 матраса с неинфицированной культурой клеток. Микроскопию инфицированных и контрольных матрасов проводили два раза в день. Цитопатическое действие вируса выражалось в характерном изменении морфологии клеток, появлении округлений и светопреломляющего эффекта. Контрольная культура сохраняла нормальную морфологическую структуру.

На следующие сутки, замороженные субкультуры оттаивали при комнатной температуре. Из каждого матраса брали пробы в количестве по 5 см3 для проверки на бактериальное загрязнение и определения активности вируса. Полученную вирусную суспензию сливали в одну емкость. К вируссодержащей 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 установках Frigera (Чехия) и Usifroid (Франция).

Сушку проводили в сублимационной установке, далее флаконы укупоривали под вакуумом с помощью прижимных плит. По окончанию сушки вакцины производили впуск стерильного воздуха через фильтр, открывали камеру и переносили кассеты с вакциной в настольный бокс, где в стерильной атмосфере флаконы с вакциной закрывали резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками. Флаконы этикетировали и упаковывали.

*4.2. Контроль сухой аттенуированной вакцины.*

Серией вакцины считается определенное количество препарата, однородное по физическим и иммунобиологическим показателям, полученное при одном режиме культивирования, изготовленное за один производственный цикл.

*Определение внешнего вида* осуществляется визуально. Брали 3 опытных образца (К1, К2 и К3) 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.

*Стерильность вакцины* проверяли по ГОСТ 28085-89. Брали испытуемые 3 опытных образца вакцины (К1, К2 и К3), в каждую внесли стерильную поддерживающую среду в объеме, равном объему до высушивания вакцины (2 см3). После растворения содержимого каждого образца стерильными пипетками делали посевы 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 0С, и 2 пробирки со средой Сабуро оставляли при температуре 24-26 0С. Вели 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) и на мышатах-сосунах. Из полученной смеси готовили десятикратные разведения, от 10-1 до 10-7 на поддерживающей среде. В 7 пробирок наливали по 4,5 см3 поддерживающей среды. В первую пробирку внесли 0,5 см3 вакцины. Чистой пипеткой смешивали содержимое первой пробирки и 0,5 см3 переносили во вторую пробирку. Последующие разведения готовили таким же методом. Разведенную вируссодержащую суспензию вводили 4 мышатам-сосунам в дозе 0,1 см3. Суспензией каждого разведения вакцины, начиная с наибольшего, заражали по 4 пробирки с культурой клеток, внесли по 1 см3 суспензии. В качестве контроля взяли 4 пробирки с культурой клеток, в которые вносили только поддерживающую среду.

Зараженные и контрольные культуры клеток в пробирках инкубировали в стационарном положении при температуре (37±0,5) 0С. Смену среды проводили через каждые 3 суток.

Таблица 5 – Титрование вируссодержащей суспензии вируса оспы

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование вирусного  материала | Разведения вируса, учет ЦПД в каждой  пробирке | | | | | | | Титр в  lg ТЦД50/см3 |
| 10-1 | 10-2 | 10-3 | 10-4 | 10-5 | 10-6 | 10-7 |
| Вируссодержащая суспензия штамма "Күл" | +  +  +  + | +  +  +  + | +  +  +  + | +  +  +  + | +  +  +  - | +  -  -  - | -  -  -  - | 5,5 |

Учет результатов титрования проводили на 12 сут. по наличию цитопатических изменений в зараженных пробирках при отсутствии таковых в контрольных культурах и по наличию живых мышат.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. Титр инфекционности вируссодержащей суспензии штамма "Күл" составил 5,5 lg ТЦД50/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. В каждую ампулу вносили по 2 см3 стерильного физиологического раствора.

Вакцину вводили подкожно морским свинкам в бесшерстный участок подмышечной области подкожно в объеме 0,5 см3 и белым мышам по 0,1 см3, За лабораторными животными наблюдали в течение 10 суток.

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

*Определение иммуногенной активности вакцины*

Для испытания взяли 3 опытных образца вакцины. В каждую ампулу вносили по 2 см3 стерильного физиологического раствора. После растворения содержимое всех ампул перенесли в стерильный стеклянный флакон емкостью 200 см3 и тщательно смешивали. Из полученной смеси готовили разведение 1: 25-1:50, 1:100 на стерильном физиологическом растворе. 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 подкожно в бесшерстный участок подмышечной области в разведении 1:25, 1:50, 1:100 по 0,1 см3. В течение 12 суток вели визуальное наблюдение за животными. Через 12 сут 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. У зараженных морских свинок измеряли температуру тела и проводили клинический осмотр в течение 14 сут.

Таблица 6 – Иммуногенная активность вакцинированных и контрольных животных

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Количество голов и вид животных | | Разведение вакцины по 0,1 см3 | Доза заражения | Результаты наблюдения | |
| гипертермия | местная реакция |
| Вакцини-рованные | 5 | 1:25 | 0,2 см3 | нет | нет |
| 5 | 1:50 | 0,2 см3 | нет | нет |
| 5 | 1:100 | 0,2 см3 | нет | нет |
| Контрольные | 5 | - | 0,2 см3 | 41,5-42,0 0С | 1,7-2,0 см |

У всех 15 привитых морских свинок отсутствовала температурная реакция и реакция в месте введения вирулентного вируса. Контрольная группа морских свинок заболела с типичными клиническими признаками: общая температура тела 41,5-42,0 0С папулы, переходящие в везикулы и пустулы в месте введения вирулентного вируса размером 1,7-2,0 см в диаметре.

*4.3. Сравнительное испытание опытной серии вакцины с коммерческой вакциной.*

Учитывая недостаточный охват профилактическими прививками овец против оспы и отсутствие иммунитета у части животных, эпизоотическая ситуация по оспе овец в Кыргызской Республике остается напряженной. Для вакцинации овец в нашей стране использовались вакцины местного, Иорданского и Российского производства, но наиболее высокий эффект дает вакцина местного производства, приготовленная из местного штамма.

Способность средств специфической профилактики создавать длительную невосприимчивость вакцинированных животных к заражению являются одной из важнейших характеристик биопрепаратов. С целью определения поствакцинального иммунитета проводили испытание сухой аттенуированной вакцины из штамма "Күл" 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 в заключение 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 вакцинированные вакциной из местного штамма на 7 день после вакцинации показывал титры 1:8 – 1:16, и в последующем титр антител поднялся до 1:128. Это свидетельствует, что вакцина из местного штамма "Күл" даёт желаемый уровень титра антител. У овец вакцинированные коммерческой вакциной титр антител увеличивался медленней по сравнению с овцами вакцинированными вакциной из местного штамма.

По результатам лабораторных исследований вакцина против оспы овец из местного штамма "Күл" является безвредной, нереактогенной, обладает высокими иммуногенными свойствами, стимулирует образование достаточно высокого уровня специфических антител и защищает вакцинированных животных при контрольном заражении вирулентным вирусом.

**ВЫВОДЫ**

1. За последние 10 лет эпизоотическая ситуация в республике по оспе овец остается не стабильной, ежегодно в регионах разведения овец регистрируется 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 все полученные значения коэффициентов обладали достаточно высоким уровнем значимости (р<0,05) и демонстрировали, что наиболее высокая связь ИФА была установлена для РДСК (r=0,822). Коэффициент корреляции между ИФА и РДП (r=0,733) указывал на менее выраженную связь.

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 ТЦД50/мл с комплементсвязывающей активностью 1:32.

5. Штамм "Күл" вируса оспы овец обладает высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью с титром 105.5 ТЦД50/см3.

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 **«Чечек 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:** чечек, вакцина, изолят, адаптация, пассаж, мониторинг, антитело, реактогендүүлүк, иммуногендүүлүк.

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

**Иштин максаты:** Кыргыз Республикасынын территориясында бөлүнгөн чечек 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 чечек ылаңынын вирусунун, "Күл" штаммы бөлүп алынган. 2009-жылы Кыргызстанда бөлүнүп алынган чечек ылаңынын вирусунун штаммынын биологиялык касиеттиери изилденген. Бөлүнүп алынган штаммдан чечек 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.