**Министерство образования и науки Кыргызской Республики**

**Кыргызский национальный аграрный университет**

**имени К.И.Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.14.489

На правах рукописи

УДК 619:616.988.7-07:636.2

**Кондибаева Жанат Буркитбаевна**

**Анализ эпизоотической ситуации и разработка технологии**

**изготовления инактивированной вакцины**

**против болезни Ауески**

**06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,**

**эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**Автореферат диссертации**

**на соискание ученой степени**

**кандидата ветеринарных наук**

**Бишкек-2015**

Диссертационнаяработа выполнена в РГП «Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности» КН МОН Республики Казахстан

|  |  |
| --- | --- |
| **Научный руководитель:**  **Официальные оппоненты:**  **Ведущая организация:** | доктор ветеринарных наук, профессор  **МамадалиевСейдигапарМамадалиевич**  доктор ветеринарных наук, член-корреспондент НАН КР, профессор  **НургазиевРысбекЗарылдыкович**  кандидат ветеринарных наук, доцент **АбеуовХайруллаБлялович**  Институт проблем биологической безопасности Таджикской Академии сельскохозяйственных наук Республики Таджикистан |

Защита диссертации состоится«27» ноября 2015 г. в 10 часов00 мин. на заседании диссертационного совета Д.06.14.489 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета (720005, г. Бишкек, ул. Медерова 68).

Автореферат разослан «16» октября 2015 г.

**Ученый секретарь**

**диссертационного совета,**

**кандидат ветеринарных наук Крутская Е.Д.**

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** В современных условиях ведения животноводства республики, когда основное поголовье сельскохозяйственных животных сосредоточено в частных подворьях, мелкотоварных фермерских и кооперативных хозяйствах, актуальность проблемы профилактики и ликвидации инфекционных заболеваний имеет свои специфические особенности.

Расширение экономических, торговых и туристических связей между государствами, возросшее значение различных транспортных средств существенно повышают вероятность заноса и распространения особо опасных болезней людей, животных и птиц.

Несомненную сложность для здравоохранения и ветеринарной службы, а также для национальной безопасности страны представляют особо опасные вирусные заболевания людей, животных, птиц и растений, периодически регистрирующиеся на территории страны. В связи с этим существует необходимость в регулярном эпизоотологическом мониторинге особо опасных болезней на территории республики и в приграничных регионах [Мамадалиев С.М., 2008].

Из всех отраслей животноводства свиноводство в республике имеет тенденцию устойчивого роста и развития. При этом все большее место в этой отрасли занимают крупные животноводческие предприятия. Показателем такой тенденции является заметный рост численности свиней. Так, на начало 2015 года общее поголовье свиней составило 840,8 тыс. голов. Преобладающую роль приобретают крупные свиноводческие комплексы с промышленной технологией производства. Однако наличие инфекционных болезней и угроза их распространения оказывают существенное тормозящее влияние на данную отрасль животноводства. Среди них определенное место занимает болезнь Ауески (БА). Она достаточно широко распространена и наносит ощутимый экономический ущерб свиноводческим хозяйствам.

Характерным свойством вируса болезни Ауески является способность оставаться в латентном состоянии и персистировать в организме свиней, являющимся основным резервуаром вируса. С учетом латентного и рецидивирующего характера этой инфекции перспективным методом ее профилактики является вакцинация, в сочетание с комплексом общих ветеринарно-санитарных мероприятий. В различных странах мира активная профилактика болезни Ауески проводится с помощью вакцин, изготовленных из инактивированного и аттенуированного вируса. Для профилактики заболевания телят до двухмесячного возраста, пушных зверей пригодна только инактивированная вакцина. Применение инактивированной вакцины целесообразно в племенных, а также неблагополучных по болезни Ауески свиноводческих хозяйствах на заключительном этапе оздоровления. Они не уступают вирусвакцинам, а в эпизоотическом отношении имеют преимущество, т.к. их можно применять в хозяйствах, независимо от сложившейся эпизоотической ситуации, тогда как вирусвакцины целесообразно применять в неблагополучных хозяйствах. Вирусвакцины способствуют формированию прочного и продолжительного иммунитета у привитых животных, но они малоэффективны или неэффективны при обработке поросят с колостральным иммунитетом. Наличие остаточнойинфекционности и продолжительные сроки инактивации вируса (15 сут) ограничивают его применение.

В этой связи разработка технологии изготовления инактивированной вакцины, оптимизация методов очистки и концентрирования, инактивации вируса, оптимизация вакцины по антигену и адъюванту представляют большой научно-практический интерес.

В республике до настоящего времени не проводились исследования по разработке технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески, тогда как потребность в отечественном препарате все более возрастает.

**Связь темы диссертации с основными научными программами.** Диссертационная работа выполнена в НИИПББ КН МОН РК в соответствие с республиканской целевой научно-технической программой РНТП Ц0252 «Научно-техническое обеспечение и организация производства биотехнологической продукции в Республике Казахстан» и «Разработка научно-обоснованной системы мониторинга особо опасных заболеваний сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей на территории РК» по НТПО 0.348.

**Цель и задачи исследований.** Целью данной работы являлся анализ эпизоотической ситуации по болезни Ауески на территории Республики Казахстан и разработка технологии изготовления инактивированной вакцины для профилактики болезни.

В процессе исследований решались следующие задачи:

- анализ эпизоотической ситуации по болезни Ауески на территории Республики Казахстан;

- отработка технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески;

- подбор наиболее чувствительной клеточной линии для размножения вируса болезни Ауески, штамма ВНИЯИ и оптимальных условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход специфического антигена данного вируса;

- усовершенствование технологичных методов очистки, концентрирования вирусной суспензии;

- подбор инактивантов и отработка оптимальных условий инактивации вируса болезни Ауески, обеспечивающих получение авирулентного препарата с сохранением его иммуногенных свойств;

- подбор адъювантов для включения в состав инактивированной вакцины;

- изучение иммунобиологических свойств инактивированной вакцины против болезни Ауески.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые в ветеринарной науке Республики Казахстан разработана технология изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески из штамма ВНИЯИ, которая по иммунобиологическим свойствам не уступает препаратам зарубежных исследователей.

Отработаны технологические параметры культивирования, концентрирования, очистки вируса, и определено эффективное соотношение адьюванта-сорбента в составе инактивированной вакцины, позволяющие повысить и сохранить продолжительное время иммуногенную активность препарата.

Изучены напряженность, сроки наступления и продолжительность поствакцинального иммунитета у сельскохозяйственных животных и пушных зверей, привитых инактивированной вакциной против болезни Ауески.

Изучено образование колостральных антител у молодняка, полученного от вакцинированных животных.

**Практическая значимость полученных результатов.** Депонированные в Депозитарии возбудителей особо опасных инфекций НИИПББ вирусы болезни Ауески могут использоваться при производстве и контроле диагностических и профилактических средств против болезни Ауески.

Впервые в отечественной ветеринарной вирусологии разработана технология изготовления и испытаны экспериментальные образцы инактивированной вакцины против болезни Ауески.

На новую вакцину разработаны:

«Технические условия на инактивированную вакцину против болезни Ауески»; утвержденные Департаментом ветеринарного надзора МСХ РК 14. 10. 2010г. СТ РГП 061040004937-040-2010 (Взамен ТУ 11 РК 4-04-98);

«Временная инструкция по изготовлению и контролю вакцины инактивированной против болезни Ауески», утвержденная Департаментом ветеринарного надзора МСХ РК 14. 10. 2010 г.

«Временное наставление по применению вакцины инактивированной против болезни Ауески», утвержденное Департаментом ветеринарного надзора МСХ РК 14. 10. 2010г.;

Внедрение научных разработок – вакцины, штаммов вируса в ветеринарную практику позволит контролировать эпизоотическую ситуацию в животноводстве по болезни Ауески, предупреждать ее энзоотии.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Проведенный соискателем эпизоотологический мониторинг по болезни Ауески, периодичность и сезонность вспышки болезни могут быть использованы как методическое указание в разработке стратегии профилактики и борьбы с этой опасной вирусной инфекцией.

Разработанная соискателем биотехнология инактивированной вакцины может быть использована в биологической промышленности для производства безопасной, иммуногенной вакцины для иммунизации восприимчивых видов сельскохозяйственных и диких животных.

Вакцина обеспечивает создание более раннего и продолжительного иммунитета у животных, что позволяет опережать развитие эпизоотии.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- анализ эпизоотической ситуации по болезни Ауески в Республике Казахстан;

**-** оптимальные параметры культивирования эпизоотического штамма ВНИЯИ вируса болезни Ауески в перевиваемой культуре клеток ВНК-21;

- оптимальный режим инактивации эпизоотического штамма ВНИЯИ вируса болезни Ауески формальдегидом;

- сравнительная характеристика иммуностимулирующей эффективности ГОА, его комплекса с сапонином в составе инактивированной вакцины из штамма ВНИЯИ;

- иммунобиологическая характеристика (способ введения вакцины, иммунизирующая доза, сроки наступления и продолжительность иммунитета) инактивированной вакцины против болезни Ауески применительно к различным видам сельскохозяйственных животных и пушных зверей.

- образование колостральных антител у молодняка, полученного от вакцинированных животных.

**Личный вклад соискателя.** Все разделы представленной работы выполнены при личном участии автора.

**Апробация полученных результатов.** Материалы диссертационной работы доложены на заседаниях ученого совета НИИПББ (1992, 1993, 1994, 1995 гг.) и обсуждены на научных конференциях: «Актуальные проблемы вирусологии», НИИПББ (1994 г.), на международных научно-практических конференциях: «Аграрная наука на рубеже веков» Акмола (1997 г.), «Биотехнология: теория и практика» (1998 г.), Материалы международной научно-практической конференции «Современной эпидемический потенциал природных очагов чумы», г. Талдыкорган, 2001 г. «Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана» 2005 г. «Жаршы журналы» 2005 г.; Международной научно-практической конференции «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» г.Алматы, 2008 г.

**Полнота отражения результатов диссертации в публикациях.** Материалы диссертации опубликованы в 15 научных работах в период 1994-2013 гг. На новую разработку получен патент Национального Патентного ведомства Республики Казахстан, разработана нормативно-техническая документация на изготовление, контроль и применение инактивированной вакцины против болезни Ауески и рекомендации по проведению противоэпизоотических и профилактических мероприятий при болезни Ауески. Утвержд.департамента ветеринарии МСХ РК от 13.10.2006 г.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и практических предложений, иллюстрирована 18 таблицами и 5 графиками. Список использованной литературы включает 230 наименований, из них 92 зарубежных источника.

**основное содержание работы**

**Во введении** представлены общие сведения, отражающие состояние изучаемой проблемы и обоснована актуальность разработки отечественной вакцины против болезни Ауески.

**В главе 1 «Обзор литературы»**. По литературным источникам дана характеристика существующих мировых технологий производства инактивированных вакцин против болезни Ауески.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** дана характеристика объектов исследований и методических подходов к выполнению исследовательской работы.

**В опытах использованы следующие материалы**: вирус болезни Ауески, штамм «ВНИЯИ» (выделен из биологического материала свиньи на территории Республики Казахстан), выращен роллерным способом в культуре клеток ВНК-21/13 с титром инфекционности не менее 7,5 lgТЦД50/см3. В опытах использованы к.р.с. 10-12 мес. возраста, овцы 10-12 мес. возраста, живой массой 30-35 кг, свиньи белой породы 3-4 мес. возраста, массой 20-25 кг, щенки 3-4 мес. возраста, кролики живой массой 1,5-2,0 кг, перевиваемые линии культур клеток эмбриона свиней (СПЭВ) и почки сирийского хомяка (ВНК-21/13), а также первичные культуры клеток почек ягнят (ПЯ) и телят (ПТ).

**Методы.**

Эпизоотическую ситуацию по болезни Ауески исследовали методом анализа статистических данных и отчетности Департамента ветеринарии МСХ РК, а также областных комитетов ветеринарии за период 1984-2014 гг.

Проведены исследования по культивированию вируса штамм «ВНИЯИ» в культуре клеток ВНК-21, выращенной в 3,0 литровых круговых сосудах. Инфицирование проводили в течение 24-36 час. после образования монослоя в дозе 0,01-0,1 ТЦД50/см 3, внося вирус в сосуды вместе с поддерживающей средой ПСП с 5% сыворотки КРС в обьеме 300±30мл. Сбор вируса проводили методом «замораживания-оттаивания» через 36-48 часов после инфицирования. Цитопатическую активность вируссодержащего материала определяли титрованием культуры клеток ВНК-21.

Титр вируса рассчитывали по методу Кербера-Ашмарина и выражали в lоg ТЦД 50/см3.

Вируснейтрализующую активность антител сывороток крови определяли в реакции нейтрализации с постоянной дозой вируса.

Для этого к двукратным разведениям сывороток добавляли равное по объему количество вируссодержащей суспензии вируса болезни Ауески, штамм «ВНИЯИ» с активностью 10-1000 ТЦД 50/см3.

Полученные смеси выдерживали в течение 1 часа при 37ºС, после чего инфицировали культуру клеток ПО (по 4 пробирки на каждое разведение сыворотки).

Инфицированную культуру клеток инкубировали при температуре (37±0,5)ºС в стационарном положении в течение 10-12 суток со сменой среды через 2 суток. Результаты реакции учитывали по появлению специфических цитопатических изменений в инфекционной культуре клеток.

Титр сыворотки рассчитывали по методу Кербера-Ашмарина и выражали в логарифмах с основанием 2 (lоg 2).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам. Определяли среднее значение выборки (Х) и среднеквадратичную ошибку (m). Достоверность различий между показателями (р<0,05) определяли с применением критерия Стьюдента. Значимость всех величин была не ниже первого критериального порога (р<0,05).

**РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**В главе 3 «Результаты исследований и их обсуждение»** изложены материалы эпизоотической ситуации по болезни Ауески на территории Республики Казахстан.

С целью выяснения эпизоотический ситуации в областях республики по болезни Ауески проведен анализ ветеринарной отчетности Департамента ветеринарии МСХ Республики Казахстан за период 1984-2013 гг. Анализ данных показал, что в животноводческих и особенно свиноводческих хозяйствах Республики Казахстан данное заболевание в период 1984 по 1995 годы регистрировалось ежегодно. Выявлено и зарегистрировано 54 неблагополучных пункта. Ежегодно по республике имелось 5-8 неблагополучных пунктов по болезни Ауески, количество заболевших животных 500-550 голов, павших 80-100 голов. Заболевание регистрировалось во всех областях Республики Казахстан.

При этом больше всего заболевание поражает свинопоголовье, особенно раннего возраста, пушных зверей и КРС. Резервуаром инфекции вероятнее всего являются крысы из животноводческих объектов.

В течение ряда лет в Республике Казахстан составляются планы противоэпизоотических мероприятий по предупреждению и ликвидации особо опасных болезней сельскохозяйственных животных.

Основой данных мероприятий является соблюдение ветеринарно-санитарных требований по предупреждению и ликвидации инфекционных заболеваний в Республике Казахстан.

Выполнение государственной программы по предупреждению и ликвидации инфекционных заболеваний позволяет уменьшить расходы, связанные с ликвидацией заболевания и улучшить эпизоотологическую обстановку в республике.

Учитывая современную нестабильную ситуацию по болезни Ауески, эпизоотологический мониторинг и разработка высокоэффективных средств профилактики является актуальной проблемой ветеринарной науки и практики.

**Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески.**

**Культивирование вируса.**

Первым этапом наших исследований являлось изучение культуральных свойств вирусаболезни Ауески штамма «ВНИЯИ», выбор чувствительной клеточной линии и отработка оптимальных условий культивирования в ней возбудителя в зависимости от множественности инфицирующей дозы; подбор времени и температуры культивирования, состава поддерживающей среды, а также концентрации сыворотки в ее составе.

Вируссодержащую суспензию получали путем заражения трехлитровых круглых сосудов с культурой клеток ВНК-21. Вирус вносили в дозах 0,01-0,1 ТЦД50\см 3, вместе с поддерживающей средой в объеме (300± 50) см 3, с 5% сыворотки КРС; 600-900 мкг/мл глютамина; антибиотиками: бензилпенициллина натриевой соли – 100 ЕД/мл, стрептомицина сульфата – 100мкг/мл.

Инкубировали сосуды с инфицированной культурой клеток при температуре 36±0,50С в роллерных аппаратах со скоростью вращения 0,2-0,4 об/мин.

Развитие вируса в культуре клеток определяли по характерному цитопатическому действию с образованием округлых светопреломляющих клеток, отслаивающихся от стенки сосуда.

При развитии выраженных цитопатических изменений (80-95% клеточного монослоя), обычно через 24-36 ч сосуды с культурой клеток замораживали при температуре не выше минус 400С.

На следующие сутки зараженные культуры оттаивали при комнатной температуре, тщательно разрушая клеточный монослой льдом. Из каждого сосуда брали пробы вируссодержащей суспензии по 5 см 3 для проверки на отсутствие бактериального загрязнения и определения активности вируса.

При активности вируса не ниже 107,5 ТЦД50/см 3 культуру объединили в один сосуд. Содержимое сосуда тщательно перемешивали и хранили при температуре 4±2оС. Полученный материал являлся основным сырьем для изготовления высокоиммуногенных вакцин.

**Очистка и концентрирование вируса болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» методом замораживания-оттаивания.**

В первой серии опытов проведены исследования по очистке и концентрированию вируссодержащей суспензии методом замораживания-оттаивания. В таблице 1 представлены результаты титрования суспензии вируса болезни Ауески до замораживания и после двукратного замораживания-оттаивания, а также результаты очистки путем осветления низкоскоростным центрифугированием.

Из данных таблицы 1 следует, титр вируса в вируссодержащей суспензии повышается после 2-х кратного замораживания-оттаивания клеточного детрита на 0,5lg ТЦД50/см3.Степень осветления вирусной суспензии, характеризующая процент удаления балластных белков после центрифугирования, достаточно высокая и составила 94,2% при норме не менее 80%. Выход вируса также увеличивался, по-видимому, за счет освобождения вируса из клеток и составил 131%.

Таблица 1 - Выход вируса болезни Ауески из суспензии после двукратного замораживания-оттаивания, n = 3 p< 0,05

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Характеристика вирусной суспензии | Объем (мл) | Количество белка (г) | Титр вируса lg ТЦД50/см3 | Степень осветления вирусной суспензии % | Выход вируса % |
| Исходные вирусные суспензии | 300,0 | 2,10±0,10 | 6,5<0,25 | - | - |
| Клетки + двукратное замораживание-оттаивание | 300,0 | 0,33±0,10 | 7,0<0,25 | - | - |
| Осветленная вирусная суспензия при 2000 об/мин 20 мин | 330,0 | 0,12±0,05 | 7,5±0,025 | 94±0,8 | 131±9,1 |

**Разработка метода очистки и концентрирования вируса болезни Ауески с использованием различных химических соединений.**

При отработке технологии концентрирования вируса использовали наиболее часто применяемые ПЭГ-115, ПЭПА-16000 и ГОА.

Для концентрирования вируса в освобожденную от клеточного детрита суспензию добавляли 50% раствор ПЭГ-115 до конечной концентрации от 4% до 8%. Смесь вируса с ПЭГ-ом выдерживали при температуре 4- 8ºС в течение 18-20 час.

По истечении указанного срока вируссодержащую суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в буферном растворе в 50 раз меньше первоначального объема. Потерю вируса болезни Ауески при концентрировании определяли по разнице в титрах исходной вируссодержащей суспензии и надосадочной жидкости. Результаты концентрирования культурального вируса болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» ПЭГ-115 представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, при концентрировании вируса ПЭГ-115 в присутствии 0,5 МNaCl и обработке вируссодержащего материала с концентрацией 4% ПЭГ, не адсорбировалось около 17% вируса. Повышение концентрации ПЭГ в суспензии вируса от 6 до 8% вызывало снижение потерь вируса. Дальнейшее повышение концентрации ПЭГ в суспензии было нецелесообразно, так как при концентрации ПЭГ 8% осаждалось более 90% вируса. Следовательно, для наиболее полного осаждения вируса из вируссодержащей суспензии оптимальной является концентрация ПЭГ-115, равная 8%.

Таблица 2 - Концентрирование вируса болезни Ауески, n=3 Р<0,05

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат  (сорбент,  флокулянт) | Концентра-цияпрепара-та в вирус-содержащей суспензии, % | Титр вируса в исходной вируссодержащей суспензии  (lg ТЦД50/см3) | Очистка вируса по белку, % | Кратность концетри-рования по объему (раз) | Потери вируса  после концентри-рования (%) |
| ПЭГ-115 +0,5 МNaCl | 4 | 7,0±0,25 | 88,1±1,8 | 100 | 17,8±0,3 |
| ПЭГ-115 +0,5 МNaCl | 6 | 7,0±0,25 | 92,3±1,3 | 100 | 10,0±0,1 |
| ПЭГ-115 +0,5 МNaCl | 8 | 7,0±0,25 | 93,4±1,29 | 100 | 5,6±0,1 |
| ПЭПА | 0,1 | 7,0±0,25 | 62,51±1,2 | 50 | 57,5±0,9 |
| ПЭПА | 0,2 | 7,0±0,25 | 63,17±1,93 | 50 | 57,3±0,9 |
| ПЭПА | 0,3 | 7,0±0,25 | 65,85±1,19 | 50 | 57,0±0,9 |
| ГОА | 0,06 | 7,0±0,25 | 83,9±0,5 | 100 | 5,6±0,1 |
| ГОА | 0,08 | 7,0±0,25 | 88,9±0,88 | 100 | 1,7±0,1 |
| ГОА | 0,10 | 7,0±0,25 | 95,4±1,68 | 100 | 1,0±0,1 |

Метод адсорбции в присутствие ПЭГ позволяет получать высококонцентрированные препараты вируса болезни Ауески с высокой иммуногенностью. Данный метод нами использован при изготовлении экспериментальных серий инактивированной концентрированной вакцины против болезни Ауески.

В следующей серии опытов для концентрирования вируса болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» нами использован полиэтиленполиамин. В вируссодержащую суспензию при постоянном перемешивании добавляли 10% раствор ПЭПА до конечных концентраций 0,1%; 0,2% и 0,3%. Затем проводили те же операции, что и при концентрировании вируса болезни Ауески ПЭГ-ом.

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что препарат ПЭПА-16000 обладает слабыми преципитирующими свойствами в отношении вируса болезни Ауески и непригоден для концентрирования вируссодержащей суспензии. Потери вируса при концентрировании ПЭПА достигали 57%.

В следующей серии опытов нами проведена оценка сорбционной способности геля гидрата окиси алюминия по отношению к вирусу болезни Ауески. Для этого использовали осветленную суспензию вируса. В вируссодержащую суспензию вносили от 0,06% до 0,1% ГОА, после 18-20-часового отстоя при температуре 4-8ºС декантировали надосадочную жидкость. Было установлено, что ГОА в конечной концентрации 0,1% обеспечивал концентрирование 99% вируса болезни Ауески, что свидетельствует о высокой сорбционной способности ГОА.

Разработана методика очистки и концентрирования вируса болезни Ауески, штамма "ВНИЯИ", позволяющая получать очищенные и высококонцентрированные суспензии вируса, пригодные в технологии изготовления инактивированных вакцин.

**Инактивация вируса болезни Ауески.**

В опытах по инактивации вируса болезни Ауески шт. ВНИЯИ с биологической активностью 7,5 lg ТЦД50/см3 использовали химические соединения формальдегида и димераэтиленимина (ДЭИ).

Выбрана температура инактивации – 370С для ДЭИ и формальдегида, рН-7,4-7,5 в течение 4-14 часов.

Установлено, что ДЭИ инактивирует вирус за 4 часа, а формальдегид за 14 часов. С увеличением концентрации инактивантов и повышением температуры инактивации усиливалось их инактивирующее действие. Производные азиридинов инактивируют вирус болезни Ауески по реакции первого порядка, в линейной зависимости. Кривая инактивации вируса с помощью формальдегида значительно отклоняется от реакции первого порядка, спад инфекционности более медленный и продолжительный. Способность формальдегида инактивировать вирус болезни Ауески примерно в 4 раза ниже в сравнение с ДЭИ.

Авирулентность инактивированной суспензии вируса болезни Ауески доказана трехкратным перепассированием в культуре клеток ВНК-21 и введением вируса подопытным кроликам.

Разработанная методика инактивации позволяет получить авирулентную суспензию вируса без снижения антигенной активности возбудителя инфекции и пригодную в технологии изготовления инактивированных вакцин против болезни Ауески. ДЭИ является дорогостоящим препаратом и не производится на территории нашей страны. Поэтому в дальнейших экспериментах по разработке технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески в качестве инактиванта использовали формальдегид.

**Изготовление инактивированных вакцинных препаратов при болезни Ауески.**

**Подбор компонентов вакцины.**

Для изготовления экспериментальных серий инактивированной вакцины использовали вирус болезни Ауески, штамм "ВНИЯИ", выращенный роллерным способом в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13 с инфекционной активностью 7,5 lg ТЦД50/см3.

Осветление вируса проводили двукратным замораживанием при минус 400С и оттаиванием при 370С. Суспензии с вирусом освобождали от клеточного детрита низкоскоростным центрифугированием.

Осветленную вируссодержащую суспензию инактивировали 0,1% формальдегидом в течение 14 часов при температуре реакционной среды 37ºС и pH 7,4-7,6. Сорбцию вирусной суспензии проводили 3% гелем ГОА, путем добавления в количестве 1% по сухому остатку. ГОА- вакцину с сапонином готовили путем добавления к ГОА-вакцине 0,05% сапонина по сухому остатку. При изготовлении масляной вакцины вирусную суспензию концентрировали 8% ПЭГ-115 и декантировали надосадочную жидкость до 10-кратного концентрата. Затем 10-кратный концентрат вакцины смешивали с масляным адъювантом «ВНИЯИ» в равных объемах. Вакцину хранили при 4-60С до использования в опытах.

**Определение иммуногенной активности инактивированной вакцины против болезни Ауески в зависимости от состава адъювантов.**

В опытах изучали адъювантные свойства гидроокиси алюминия, гидроокиси алюминия с сапонином и масляного адъюванта штамма «ВНИЯИ».

Иммуногенную активность вакцин определяли количественным методом на овцах 10-12-месячного возраста. С этой целью использовали 3 группы животных по 8 голов, которых разделили на 4 подгруппы, по 2 головы в каждой. Иммунизировали животных подкожно вакциной в цельном виде и в разведениях 1:3, 1:9 и 1:27 в дозе 2 см3. На 21 сут после вакцинации всех привитых и двух контрольных животных заражали вирулентным вирусом болезни Ауески штамма "ВНИЯИ" в дозе 104 ЛКД50/см3.

За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 сут после заражения. Для изучения гуморального иммунитета у животных через 10, 14 и 21 сут после иммунизации брали пробы крови; 50% иммунизирующую дозу (ИмД50) рассчитывали по формуле Кербера-Ашмарина. В результате установлено, что наиболее приемлемым адъювантом в составе инактивированной вакцины против болезни Ауески является ГОА с сапонином, ИмД50 инактивированных вакцин, содержащих в своем составе гидроокись алюминия, гидроокись алюминия с сапонином и масляный адъювант "ВНИЯИ", соответственно составил 0,062; 0,052; и 0,062 см3. Контрольные животные пали на 7-8 сут после заражения с проявлением характерных клинических признаков болезни Ауески.

Титры вируснейтрализующих антител у овец, привитых различными вариантами инактивированной вакцины, представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Уровень ВНА в крови животных, привитых ГОА-вакциной с сапонином, ГОА и масляной вакциной, n=3

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Состав вакцины | Разведения вакцины | Титр ВНА в log2 по сут | | |
| 10 сут | 14 сут | 21 сут |
| ГОА-вакцина с сапонином | цельная | 3,5±0,2 | 4,0±0,3 | 5,5±0,4 |
| - // - | - // - | 3,0±0,2 | 4,0±0,4 | 5,0±0,3 |
| - // - | 1:3 | 3,0±0,2 | 3,2±0,2 | 3,5±0,3 |
| - // - | - // - | 2,5±0,1 | 2,5±0,2 | 3,5±0,3 |
| - // - | 1:9 | 2,5±0,1 | 2,5±0,2 | 3,0±0,2 |
| - // - | - // - | 2,5±0,1 | 2,5±0,2 | 3,0±0,2 |
| - // - | 1:27 | 1,5±0,0 | 2,0±0,2 | 2,5±0,2 |
| - // - | - // - | 2,0±0,1 | 2,0±0,2 | 2,5±0,2 |
| ГОА-вакцина | цельная | 2,0±0,1 | 2,5±0,3 | 3,5±0,3 |
| - // - | - // - | 2,0±0,1 | 2,5±0,3 | 3,5±0,3 |
| - // - | 1:3 | 2,0±0,1 | 2,5±0,3 | 3,0±0,3 |
| - // - | - // - | 1,5±0,1 | 2,0±0,2 | 3,0±0,3 |
| - // - | 1:9 | 1,5±0,1 | 2,0±0,2 | 2,5±0,2 |
| - // - | - // - | 1,5±0,2 | 2,0±0,2 | 2,5±0,2 |
| - // - | 1:27 | 1,0±0,1 | 1,0±0,1 | 2,0±0,2 |
| - // - | - // - | 1,5±0,1 | 1,5±0,1 | 2,0±0,2 |
| Масляная вакцина | цельная | 3,5±0,2 | 4,0±0,1 | 4,5±0,3 |
| - // - | - // - | 3,0±0,2 | 3,5±0,1 | 4,0±0,3 |
| - // - | 1:3 | 2,5±0,1 | 3,0±0,2 | 3,5±0,3 |
| - // - | - // - | 2,5±0,1 | 2,0±0,1 | 3,0±0,3 |
| - // - | 1:9 | 1,5±0,1 | 2,0±0,1 | 2,5±0,2 |
| - // - | - // - | 1,5±0,1 | 2,0±0,1 | 2,5±0,2 |
| - // - | 1:27 | 1,0±0,1 | 1,5±0,1 | 1,75±0,1 |
| - // - | - // - | 1,0±0,1 | 1,5±0,1 | 2,0±0,2 |

Установлено, что ГОА с сапонином является более приемлемым адъювантом в составе инактивированной вакцины против болезни Ауески.

ГОА вакцина с сапонином при подкожном введении обладает более высокой иммуностимулирующей активностью по сравнению с ГОА и масляной вакциной.

**Проверка стерильности, безвредности, авирулентности и реактогенности инактивированной вакцины против болезни Ауески.**

Нами были изучены стерильность, безвредность, авирулентность и реактогенность ГОА-вакцины с сапонином и масляной вакцины против болезни Ауески.

Установлено, что посевы из вакцин на бактериологические среды не давали роста микрофлоры, а подопытные животные, привитые вакцинами, оставались здоровыми. Остаточную вирулентность вакцин не удалось обнаружить пассажами в культуре клеток ПО и введением препаратов чувствительным животным.

При изучении реактогенности вакцины особое внимание уделяли учету местных и общих реакций. Местные реакции учитывали по появлению инфильтрата на месте введения вакцины. Общие реакции оценивали на основании клинических признаков у животных при ежедневной термометрии в течение 14 сут после вакцинации. С этой целью овец вакцинировали ГОА-вакциной с сапонином, масляной вакциной и ГОА-вакциной. Установлено, что у овец после иммунизации ГОА-вакциной, ГОА-вакциной с сапонином и масляной вакциной на месте введения появлялись творожистые инфильтраты, максимальные размеры которых составила соответственно 2,0х2,0 и 2,5х3,0 см3. Клиническое состояние животных оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода наблюдения.

При патологоанатомическом вскрытии обнаружено, что на месте введения препарата образовался плотный соединительнотканный инфильтрат, который рассасывается через 25-30 сут после вакцинации. При повторном введении вакцины аллергических реакций не отмечалось.

Опытами установлено, что инактивированные вакцины против болезни Ауески являются стерильными, авирулентными, безвредными и умеренно реактогенными препаратами. Из испытанных препаратов ГОА вакцина с сапонином обладает более высокой иммуногенной активностью.

**Определение срока годности инактивированной вакцины против болезни Ауески.**

Особое значение при хранении вакцин придается сохранности иммуногенной активности, которая определяет предельно допустимый срок годности препарата. С целью определения срока годности инактивированной вакцины изучали влияние температуры на стабильность иммунизирующего антигена препаратов в процессе хранения в течение 12 месяцев. Проверяли иммуногенную активность ГОА-вакцины с сапонином против болезни Ауески до и после соответствующего срока хранения при температуре 4-6оС.

В опытах использовали ГОА-вакцину с сапонином, полученную методом концентрирования ПЭГ-115. Иммуногенную активность вакцины определяли количественным методом на овцах. Разведения вакцины готовили на забуференномфизрастворе. Животных прививали в дозе 2см3 цельной вакциной и в разведениях 1:3, 1:9 и 1:27. Через 21 сут после иммунизации всех подопытных и двух контрольных животных заражали вирулентным вирусом болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» в дозе 10 4 ЛКД50/см3. За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 сут после заражения.

Общее состояние иммунизированных животных в течение всего периода наблюдения было удовлетворительным, клинических признаков болезни не отмечено. Контрольные животные пали на 5-7 сут после заражения.

Установлено, инактивированная вакцина против болезни Ауески при температуре 4-6ºС сохраняла иммуногенную активность в течение 12 мес. (срок наблюдения). Следовательно, хранение инактивированной ГОА- вакцины с сапонином при температуре 4-60С не снижает ее иммуногенную активность.

**Определение ИмД50 инактивированной вакцины против болезни Ауески для разных видов животных.**

Для экспериментов было отобрано по 8 голов крупного рогатого скота, свиней, овец и щенков собак, которых разделили на 3 группы по 2 головы в каждой. Первую, вторую и третью группу животных иммунизировали инактивированной вакциной гидроокисьалюминиевой с сапонином против болезни Ауески в разведениях 1:3, 1:9 и 1:27 в дозе 2 см3 для КРС, овец и свиней и 1 см3 для щенков собак.

Через 21 сутки после иммунизации всех вакцинированных и двух контрольных животных каждого вида заражали вирулентным вирусом болезни Ауески, шт. «ВНИЯИ» в дозе 104 ЛКД50/см3 для КРС, овец и свиней и 10 ЛКД50/см3 для щенков. Крупный рогатый скот, овец и щенков иммунизировали и заражали подкожно, а свиней вакцинировали внутримышечно и заражали подкожно. За животными вели клиническое наблюдение в течение 21 сут после заражения. 50% иммунизирующую дозу (ИмД50) определяли по формуле Кербера-Ашмарина.

В результате исследований было установлено, что все вакцинированные животные не реагировали на введение вирулентного вируса болезни Ауески. Общее состояние иммунизированных животных в течение всего периода наблюдения было удовлетворительным, клинических признаков болезни не отмечено. ИмД50 вакцины равнялось 0,052 см3 для КРС, овец, свиней и 0,021 см3 для щенков. В прививном объеме содержалось более 37 ИмД50 для КРС, овец, свиней и более 47 ИмД50 для щенков. Контрольные овцы и щенки пали на 5-7 и 10-11 сут после заражения. Первый контрольный поросенок пал, а второй заболел на 5 сутки после заражения с проявлением клинических признаков болезни Ауески. Контрольные телята заболели на 5-7 сут после инфицирования.

Следовательно, однократная иммунизация КРС, овец, свиней и щенков инактивированной вакциной против болезни Ауески в разведениях 1:3, 1:9 и 1:27 предохраняет животных от заражения вирусом болезни Ауески. ИмД50 вакцины равнялась 0,052 см3для взрослых КРС, овец и свиней и 0,021 см3 для щенков.

**Изучение сроков формирования иммунитета у животных, привитых инактивированной вакциной против болезни Ауески.**

Иммуногенность вакцин находится в прямой зависимости от концентрации антигена в прививной дозе. Чем выше активность препарата, тем более высокой иммуногенностью он обладает, создавая у животных напряженный иммунитет в короткие сроки и на длительный период после прививок.

Нами изучено влияние кратности иммунизации и интервала между вакцинациями на напряженность и продолжительность иммунитета после введения вакцины. Иммуногенные свойства вакцины исследовали после ее хранения в различных температурных условиях.

Исследования проводили на овцах 10-12 и поросятах 3-4 месячного возраста. Для опыта были отобраны клинически здоровые животные в количестве 6 голов, которых разделили на 3 группы, по 2 головы в каждой. Каждую группу животных иммунизировали ГОА-вакциной с сапонином в дозе 2 см3 за 6, 4 и 2 сут до заражения. По истечении указанного срока всех животных из каждой группы и двух контрольных животных заражали вирулентным вирусом болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» в дозе 104 ЛКД50/см3. При этом овец иммунизировали и заражали подкожно, а свиней вакцинировали внутримышечно и заражали подкожно.

За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 сут после заражения, ежедневно измеряя у них температуру тела, отбирали пробы крови на 2, 4 и 6 сут после вакцинации для определения уровня ВНА.

В результате исследований установлено, что овцы и поросята, иммунизированные за 4 и 6 сут. до заражения, были невосприимчивы контрольному инфицированию вирусом болезни Ауески. Общее состояние животных было удовлетворительным, клинических признаков заболевания не обнаружено. Овцы и поросята из другой группы, иммунизированные за 2 и 4 сут до заражения, проявили клинические признаки болезни Ауески на 5-7 сут после заражения. Контрольные овцы пали, а поросята заболели на 5-6 сут после инфицирования.

Появление ВНА в сыворотке крови овец зафиксировано на 4 сут, а у свиней – на 6 сут после вакцинации с титром 1:2, 1:4.

Следовательно, инактивированная вакцина против болезни Ауески способствует формированию напряженного иммунитета у привитых овец и поросят на 4-6 сут после вакцинации.

**Определение продолжительности иммунитета, создаваемого инактивированной вакциной.**

Одним из главных требований к вакцинам является способность создавать более ранний и продолжительный иммунитет у восприимчивых животных.

Применение таких вакцин в очаге инфекции позволит опережать развитие эпизоотического процесса и обрывать его через несколько дней после иммунизации животных.

Инактивированную вакцину гидроокисьалюминиевую с сапонином вводили двукратно с интервалом в 21 сут, подкожно в дозе 2 см3 при каждой иммунизации. С целью контроля иммунологического состояния животных, сыворотки их крови исследовали в реакции нейтрализации через 7, 14 и 21 сут после однократного введения вакцины и ежемесячно после ревакцинации.

Для определения напряженности иммунитета проводили контрольное заражение четырех привитых и двух неиммунных овец через 6, 9 и 12 мес после ревакцинации. Для заражения животных использовали вирулентный вирус болезни Ауески шт. «ВНИЯИ» в дозе 104 ЛКД50/см3, который вводили подкожно. За животными вели клиническое наблюдение с ежедневной термометрией в течение 14 сут после заражения. Лабораторными исследованиями установлено, что все вакцинированные животные были невосприимчивые к контрольному заражению вирусом болезни Ауески через 6, 9 и 12 мес. после иммунизации.

Общее состояние животных в течение всего периода наблюдения было удовлетворительным, клинических признаков болезни не отмечено.

Контрольные животные пали на 5-7 сут после заражения. Исследования проб сывороток крови показали, что титры ВНА через 7, 14 и 21 сут после иммунизации были соответственно 1,75 лог2, 2,0 лог2 и 2,5 лог2. Результаты исследования сывороток крови, отобранных в более поздние сроки после вакцинации, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Титры ВНА в крови овец, вакцинированных инактивированной вакциной против болезни Ауески

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Схема  вакцинации | Титры антител в lоg2 по дням | | | Титры антител в lоg2 по месяцам года | | | | | | | | | | | |
| 7 | 14 | 21 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Двукратная с интервалом в 21 сут | 1,75 + 0, 24 | 2,0 + 0,19 | 2,5 +014 | 3,0±0,12 | 4,0±0,19 | 5,0±0,8 | 5,5±0,29 | 5,5±0,12 | 5,0±0,0,9 | 4,5±0,15 | 4,0±0,25 | 3,5±0,12 | 3,0±0,25 | 2,5±0,19 | 2,0±0,14 |

Лабораторными исследованиями установлено, что инактивированная вакцина против болезни Ауески при двукратной вакцинации животных создает напряженный иммунитет длительностью 12 мес.

**Изучение колострального иммунитета, создаваемого инактивированной вакциной против болезни Ауески.**

Для изучения формирования колострального иммунитета у ягнят 8 суягных овец иммунизировали ГОА-вакциной с сапонином против болезни Ауески двукратно с интервалом в 21 сут., в объеме 2 см3 при каждой вакцинации.

Отмечено, что титр ВНА у суягных овец на 30 сут. после иммунизации составил 4,0-4,5 лог2. У ягнят, полученных от иммунных овец, пробы крови отбирали через 2, 10, 14 и 21 сут после рождения, и далее ежемесячно. Сыворотки крови исследовали в реакции нейтрализации по общепринятой методике. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Динамика формирования колострального иммунитета у ягнят

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  жив-х | Дни после рождения ягнят и титр ВНА (log2) | | | | | | | |
| 2 | 10 | 14 | 21 | 30 | 60 | 90 | 120 |
| 1 | 3,0±0,19 | 3,0±0,19 | 3,25±0,19 | 3,50±0,08 | 4,5±0,12 | 4,0±0,07 | 3,0±0,19 | 1,5±0,14 |
| 2 | 3,0±0,25 | 3,25±0,19 | 3,25±0,14 | 3,56±0,09 | 4,0±0,25 | 4,0±0,25 | 3,0±0,09 | 1,0±0,14 |
| 3 | 3,25±0,19 | 3,5±0,14 | 3,75±0,19 | 4,0±0,12 | 4,50±0,14 | 4,0±0,12 | 3,0±0,12 | 1,25±0,19 |
| 4 | 4,0±0,19 | 4,25±0,12 | 4,25±0,12 | 4,5±0,04 | 5,0±0,08 | 4,5±0,19 | 3,25±0,24 | 1,5±0,14 |
| 5 | 3,56±0,14 | 4,0±0,19 | 4,25±0,19 | 4,5±0,14 | 5,0±0,12 | 4,5±0,21 | 3,25±0,12 | 1,5±0,12 |
| 6 | 3,5±0,19 | 3,5±0,08 | 4,0±0,14 | 4,5±0,12 | 5,0±0,19 | 4,5±0,12 | 2,75±0,24 | 1,5±0,12 |
| 7 | 4,5±0,12 | 4,5±0,1 | 4,75±0,12 | 5,0±0,25 | 5,0±0,9 | 4,0±0,14 | 3,0±0,12 | 1,0±0,19 |
| 8 | 4,5±0,14 | 4,5±0,12 | 4,5±0,25 | 4,75±0,19 | 5,0±0,12 | 4,75±0,19 | 3,0±0,12 | 1,25±0,12 |

Данные таблицы 5 показывают, что ягнята, полученные от иммунных овец, имели высокие титры ВНА, их рост длился до 21-30 сут. Позже они оставались на прежнем уровне в течение месяца и далее постепенно снижались до 1,0-1,5 лог2 к 4-месячному возрасту.

Изучено влияние колострального иммунитета на иммуногенную активность ГОА-сапонин вакцины против болезни Ауески. Для этого проводили вакцинацию ягнят от иммунных овец через 4 мес. после рождения. Ягнятам вакцину вводили подкожно в дозе 1см3 в область внутренней стороны бедра.

В результате исследований установлено увеличение уровня ВНА до 4,0±0,15лог2 на 21 сут после вакцинации.

Следовательно, ГОА-сапонин вакцина после однократного введения индуцирует образование высокого уровня ВНА у ягнят на фоне колострального иммунитета. Аллергических реакций на введение вакцины против болезни Ауески у привитых ягнят не наблюдалось.

Таким образом, при проведении профилактических прививок ягнят против болезни Ауески, родившихся от овцематок, иммунизированных вакциной из штамма «ВНИЯИ», следует учитывать возможный высокий уровень ВНА в крови ягнят. Вакцинацию ягнят следует проводить через 4 мес. после рождения.

**ВЫВОДЫ**

1. Анализом эпизоотической ситуации по болезни Ауески в Республике Казахстан установлено, что эта болезнь на территории страны регистрируется спорадически и наносит ощутимый экономический ущерб животноводству. При этом БА эндемична во всех регионах республики и проявляется периодически среди КРС, овец, свиней, собак и грызунов. За последние 20 лет вспышки этой болезни отмечались в 54 пунктах. При болезни Ауески заболеваемость и летальность животных уменьшается с возрастом и составляет соответственно в возрасте – молодняк – 94-100%, более старшего возраста- 35-40%.

2. Впервые в Республике Казахстан разработана технология изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески из штамма «ВНИЯИ», включающая культивирование, очистку вируса методом двукратного замораживания-оттаивания, инактивацию формальдегидом, сорбцию вирусной суспензии на ГОА и использование в качестве дополнительного адъюванта сапонина.

3. Отработаны параметры культивирования производственного вируса в культуре клеток ВНК-21, которые позволяют стабильно получать вирус с инфекционной активностью не менее 7,5 lg ТЦД50/см3 (заражающая доза вируса в пределах от 0,01 до 0,1 ИД50, температура инкубации 37±0,50С, продолжительность инкубации 36-48 ч).

4. Разработана методика инактивации вируса болезни Ауески с использованием инактивантов в конечной концентрации формальдегида 0,1% и ДЭИ 0,1%, позволяющая получать авирулентную суспензию возбудителя в течение 4 и 14 час при 37ºС без снижения его антигенной активности; Разработана методика очистки и концентрирования вируса болезни Ауески при помощи ГОА, ПЭГ-115 и адсорбирующего комплекса.

5. ГОА с сапонином являются более эффективным адъювантом в составе вакцины против болезни Ауески. Вакцина является стерильным, авирулентным, безвредным и умеренно реактогенным биопрепаратом, создает при однократной иммунизации напряженный иммунитет с титрами антител 1:4 до 1:8 в рН на 4-6 сутки, продолжительностью 12 мес. Хранение инактивированной ГОА-сапонин вакцины при температуре 4-6ºС не снижает ее иммуногенной активности в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

6. Ягнята, родившиеся от иммунных овец, приобретают колостральный иммунитет с молозивом продолжительностью до 4 мес. Иммунизацию ягнят целесообразно проводить в 4-х месячном возрасте, по мере снижения колостральных ВНА против болезни Ауески, которые могут оказать существенное влияние на эффективность проводимых защитных мероприятий.

**ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Разработанную технологию изготовления вакцины инактивированной против болезни Ауески из эпизоотического штамма ВНИЯИ предлагается использовать в биологической промышленности для получения безопасной и иммуногенной вакцины для восприимчивых сельскохозяйственных животных и пушных зверей (КРС, овцы, свиней, кролики и собаки).

Разработан и утвержден в установленном порядке комплект НТД на вакцину:

- СТ РГП 061040004937-040-2010 (Взамен ТУ 11 РК 4-04-98). Вакцина, инактивированная против болезни Ауески. Жамбылская область, 21 стр.;

- Временная инструкция по изготовлению и контролю инактивированной вакцины против болезни Ауески. Жамбылская область, 27 стр.;

- Временное наставление по применению вакцины инактивированной против болезни Ауески. Жамбылская область, 3 стр.

- Рекомендации по проведению противоэпизоотических и профилактических мероприятий при болезни Ауески. Утвержд. Директором Департамента ветеринарии МСХ РК от 13.10.2006 г.

- Патент на изобретения национального института интеллектуальной собственности Министерства юстиции Республики Казахстан.

**Список опубликованных работ по теме диссертации:**

1. Кондибаева, Ж.Б. Оценка эффективности различных методов концентрирования вируса болезни Ауески [Текст] /Ж.Б. Кондибаева, Л.В. Маликова., Б.М. Хайруллин. // Тез. научн. конф. «Актуальные проблемы вирусологии», пгт Гвардейский, 1994. Том 1. – С.62-63.
2. Кондибаева, Ж.Б. Количественная оценка иммуногенности инактивированной вакцины против болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин. // Тез. научн. конф. «Актуальные проблемы вирусологии», пгт Гвардейский, 1994. Том 2. – С.55-56.
3. Кондибаева, Ж.Б. Изучение иммуногенной активности инактивированной вакцины против болезни Ауески для разных видов животных [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин, Л.В. Маликова. // Биотех. Теория и практ., 1998. - №1-2 (5-6). – С. 56-58.
4. Кондибаева, Ж.Б. Определение продолжительности иммунитета создаваемого инактивированной вакциной против болезни Ауески [Текст] / Б.М. Хайруллин, Ж.Б. Кондибаева. // Материалы межд. конф. Аграрная наука на рубеже веков. - Акмола, 1997. - Том 5. – С.9-11.
5. Кондибаева, Ж.Б. Изучение иммуногенных свойств инактивированной вакцины против болезни Ауески. [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. - Вып.4. Материалы межд. науч.- практ. конф. Современный эпидемический потенциал природных очагов чумы. - Талдыкорган, 2001 г. – С.177-179.
6. Кондибаева, Ж.Б. Изучение иммуногенной активности инактивированной вакцины против болезни Ауески в зависимости от состава адъювантов [Текст] / Ж.Б. Кондибаева // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана в № 11. – С.57-59.
7. Қондыбаева, Ж.Б. Ауески ауруына қарсы әлсіздендірілген вакцинаның иммунитеттік құбылыс мерзімін зерттеу [Текст] / Ж.Б. Қондыбаева // Жаршы журналы № 10 Бастау баспасы ЖШС, 2005. – С.21-24.
8. Кондибаева, Ж.Б. Изучение колострального иммунитета у ягнят, создаваемого инактивированной вакциной против болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин // Материалы межд. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития». Алматы, 19-21 мая 2008 г. – С.344-346.
9. Кондибаева, Ж.Б. Современные тенденции предупреждения и ликвидации болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин // Материалы межд. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» Алматы, 19-21 мая 2008 г. – С.533-535.
10. Кондибаева, Ж.Б. Сравнительное изучение инактивации вируса болезни Ауескидимеромэтиленимина и формальдегидом [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин // . Казахский агротехнический университет им С.Сейфуллина Журнал Вестник науки, Астана, 2011. - №2. – С.9-14с.
11. Кондибаева, Ж.Б. Разработка оптимальных условий культивирования вируса болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева, Б.М. Хайруллин // КазНАУІзденістер, нәтижелер. Алматы, 2011. - № 2. – С.82-86.
12. Кондибаева, Ж.Б. Разработка метода очистки и концентрирования вируса болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева // Кыргызский научно-исследовательский институт животноводства, ветеринарии и пастбищ имени А.Дуйшеева. Журнал Вестник. – Бишкек, 2013. - № 8. – С. 117-121.
13. Кондибаева, Ж.Б. Инактивированная вакцина против болезни Ауески для иммунизации сельскохозяйственных животных и пушных зверей [Текст] /Ж. Б. Кондибаева // КазНАУІзденістер,нәтижелер., Алматы, 2013. - №2(058). - С 23-29.
14. Кондибаева, Ж.Б. Изучение реактогенности и безвредности вакцины против болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева // Электронный журнал ВАК КР. – Бишкек, 2013. - №2. - С 4-8.
15. Кондибаева, Ж.Б. Подбор системы культивирования для вируса болезни Ауески [Текст] / Ж.Б. Кондибаева // Электронный журнал ВАК КР. – Бишкек, 2013. - №2. - С 8-14.

**Кондибаева ЖанатБуркитбаевнанын**

«Ауески ылаңынын эпизоотиялык жагдайына анализ жүргүзүү жана ага каршы инактивацияланган вакцина даярдоонун технологиясын иштепчыгуу» темасында 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология мененбиргемикотоксикологияжана иммунология адистигибоюнча ветеринария илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын

**КОРТУНДУСУ**

**Негизги сөздөр:** Ауески ылаңы, ВНИЯИ штаммы, эпизоотиялык жагдай, инактивацияланган вакцина, иммунологиялык касиеттер.

**Изилдөө объектиси:** Ауески ылаңы менен дарттануучу айыл чарба жана жапайы жаныбарлар, Ауески ылаңына каршы инактивацияланган вакцина, вирустун штаммдары, жаныбарлардын канынын сары суусу.

**Иштин максаты:** Казахстан Республикасынын аймагында Ауески ылаңы боюнча эпизоотиялык жагдайга анализ жургүзүү жана бул ыланга каршы инактивацияланган вакцинанын биотехнологиясын иштеп чыгуу.

**Изилдөө ыкмалары:** эпизоотологиялык мониторинг, вирусологиялык, серологиялык, иммунологиялык, ВНК-21 клеткасынын культурасында вирустарды өстүрүү.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы:** Казахстан Республикасында биринчи жолу Ауески ылаңына каршы “ВНИЯИ” штаммынан инактивацияланган вакцинаны даярдоонун технологиясы иштелип чыкты.

ВНК-21 клетканын культурасында өндүрүштүк вирусту өстүрүүнүн жол-жоболору такталды.

Ауески ылаңынын вирусун инактивациялоонун ыкмасы иштелип чыкты; ГОА, ПЭГ-115 жана адсорбиялоочу комплекстердин жардамы менен Ауески ылаңынын вирусун тазалоо жана көбөйтүү ыкмалары иштелип чыкты.

Инактивацияланган вакцинанын ниммунобиологиялык касиеттери изилденди. Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы 2002-жылдын 15-февралында А.С. №14294 патент менен тастыкталды. Инактивацияланган вакцинаны чарбанын шартында тоготкуч жаныбарларга сынаганда, ал өзүнүн жогоруу антигендүүлүгүн жана иммуногендүүлүгүн көрсөттү.

**Колдонуу чөйрөсү:** практикалык ветеринария, эпизоотология, ветеринардык вирусология, биотехнология.

**РЕЗЮМЕ**

диссертации Кондибаевой Жанат Буркитбаевны на тему: «Анализ эпизоотической ситуации и разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Ключевые слова:** болезнь Ауески, штамм ВНИЯИ, эпизоотическая ситуация, инактивированная вакцина, иммунологические свойства.

**Объект исследований:** восприимчивые к болезни Ауески сельскохозяйственные и дикие животные, инактивированная вакцина против болезни Ауески, штаммы вируса, сыворотки крови животных.

**Цель исследования:** анализ эпизоотической ситуации на территории Республики Казахстан по болезни Ауески и разработка биотехнологии инактивированной вакцины против данной инфекции.

**Методы исследований:** эпизоотологический мониторинг, вирусологические, серологические, иммунологические, культивирование вирусов в культуре клеток ВНК-21.

**Полученные результаты и их новизна:** впервые в Республике Казахстан разработана технология изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески из штамма «ВНИЯИ».

Отработаны параметры культивирования производственного вируса в культуре клеток ВНК-21.

Разработана методика инактивации вируса болезни Ауески; разработана методика очистки и концентрирования вируса болезни Ауески при помощи ГОА, ПЭГ-115 и адсорбирующего комплекса.

Изучены иммунобиологические свойства инактивированной вакцины. Новизна полученных результатов подтверждена патентом А.С.№14294 от 15.02.2002 г. Инактивированная вакцина при испытании на естественно восприимчивых животных показала высокую антигенную и иммуногенную активность.

**Область применения:** практическая ветеринария, эпизоотология, ветеринарная вирусология, биотехнология.

**SUMMARY**

candidate's thesis of veterinary sciences of KondibayevaZhanatBurkitbayevna

“Analysis of the epizootological situation and development of the technology for manufacturing of the inactivated vaccine against Aujeszky’s disease”, specialty 06.02.02 – veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

**Key words:** Auyeski's illness, VNIYaI strain, an epizootic situation, the inactivated vaccine, immunological properties.

**Research object:** farm and wild animals, susceptible to Auyeski's illness, the inactivated vaccine against Auyeski's illness, strains of a virus, serum of blood of animals.

**Research aim:** the analysis of an epizootic situation in the territory of the Republic of Kazakhstan due to illness Auyeski and development of biotechnology of the inactivated this infection vaccine.

**Research methods:** epizootologichesky monitoring, virosologic, serologichesky, immunological, cultivation of viruses in culture of cages of VNK-21.

**The obtained results and their novelty:** for the first time in the Republic of Kazakhstan the manufacturing techniques of the inactivated vaccine against Auyeski's illness from a strain of "VNIYaI" are developed.

Parameters of cultivation of a production virus in culture of cages of VNK-21 are fulfilled.

The technique of an inactivation of a virus of an illness of Auyeski is developed; the technique of cleaning and concoction of a virus of an illness of Auyeski by means of GOA, PEG-115 and the adsorbing complex is developed.

Immunobiological properties of the inactivated vaccine are studied. Novelty of the received results is confirmed with the patent A.C.№14294 of 15.02.2002. The inactivated vaccine at test for naturally susceptible animals showed high antigene and immunogene activity.

**Field of application:** practical veterinary, epizootologiya, veterinary virology, biotechnology.