

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ ГОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Диссертационный совет Д 03.23.680

На правах рукописи
УДК 578:821.2:831.2:274

Аманова Жанат Темирбаевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ
АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЧУМЫ МЕЛКИХ
ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ОСПЫ ОВЕЦ**

03.01.06 – Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2023

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ Республики Казахстан и в Институте биотехнологии НАН Кыргызской Республики.

**Научный
руководитель:**

Жунушов Асанкадыр Темирбекович
доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН
КР

**Официальные
оппоненты:**

Керимжанова Бакытжан Фазылжановна
доктор ветеринарных наук, профессор, академик
КазАСХН и РАЕ, заместитель начальника отдела
международного научного сотрудничества АО «Научный
центр противоинфекционных препаратов» РК
Акматова Эльмира Казакбаевна
доктор биологических наук, профессор, зав.кафедрой
“Фундаментальные дисциплины” Международной
школы медицины Международного университета
Кыргызстана

**Ведущая
(оппонирующая)
организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение “Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии ” (ФГБНУ ФИЦВиМ)
(Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос.
Вольгинский, ул. Академика Бакулова, 1)

Защита диссертации состоится «27» ноября 2023 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 03.23.680 по защите диссертаций на соискание ученой степени (доктора) кандидата биологических наук при Институте биотехнологии НАН Кыргызской Республики и Институте горной физиологии и медицины НАН Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а, 303 ауд. https://vc.vak.kg/b/d_0-hz5-j9k-ng6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национальной академии наук КР, по адресу: г. Бишкек, пр. Чуй, 265 и на сайте <http://vak.kg>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Казыбекова А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Географическое распространение чумы мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) и оспы овец (ОО) в последние годы вызывают серьезную озабоченность, так как, несмотря на полувековую историю открытия их возбудителей, а также разработку и совершенствование профилактических средств и методов борьбы, эти болезни все еще остаются одним из главных проблем ветеринарии (Аманова Ж.Т. и др., 2019).

Для территории Республики Казахстан (РК) и стран Средней Азии эти две болезни всегда представляют серьезную биологическую угрозу. В связи, с чем ветеринарная служба РК, с целью предотвращения заноса данных заболеваний из приграничных стран, ежегодно проводит вакцинацию овец и коз в зоне повышенного риска живыми моновалентными вакцинами против ЧМЖЖ и ОО.

Использование двух моновалентных вакцин требует от ветеринарных специалистов и животноводов проведения двукратной компании вакцинопрофилактики, для которых необходимы отдельные временные, трудовые и финансовые затраты. Поэтому, в целях исключения перечисленных и других негативных явлений проявляющихся при применении моновалентных вакцин и проведении других ветеринарных вмешательств, ученые из ряда стран (Fakri, F. et all. 2015, Martrenchar, A. et all. 1997, Ayelet, G. et all. 2012, Chaudhary, S. S. et all. 2009, Константинов А.В., и др., 2018, Балышев В.М., и др., 2010) разработали ассоциированную вакцину против ЧМЖЖ и ОО.

Нестабильность эпизоотической ситуации по ЧМЖЖ и ОО среди мелкого рогатого скота (МРС) в мире, а также борьба с ЧМЖЖ в глобальном масштабе подтверждает актуальность исследований, проведенных в этой работе.

В Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности (НИИПББ) была разработана технология изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО. Однако трудоемкая технология изготовления и низкая иммуногенность существующей ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО привели к увеличению затрат на получение промышленной серии вакцины, что также повлияла бы на стоимость вакцины.

В связи с этим, с целью устранения негативных явлений, связанных с технологией изготовления, с низкой иммуногенностью существующей ассоциированной вакцины, возникла необходимость усовершенствовать технологию изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО и изучить ее иммунобиологические свойства.

Связь темы диссертации с научными программами (проектами) и основными научно-исследовательскими работами. Диссертационная работа выполнена в РГП на ПХВ НИИПББ в рамках проектов грантового финансирования № ГР 0112РК00301 «Разработка технологии изготовления ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец».

Цель исследования. Проведение научно-исследовательских работ по совершенствованию технологии изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО и оценка ее иммунобиологических свойств.

Задачи исследования:

1. Адаптация штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero (линия клеток почки африканской зеленой марышки) и оценка его иммунобиологических свойств;
2. Совершенствование условий культивирования вируса ЧМЖЖ и ОО на клеточной линии Vero роллерным методом;
3. Совершенствование технологии приготовления ассоциированной суспензии вирусов ЧМЖЖ и ОО и конструирование экспериментальных серии вакцины;
4. Оценка иммунобиологических свойств совершенствованной ассоциированной вакцины.
5. Оценка стабильности совершенствованной ассоциированной вакцины при различных температурно-временных режимах.
6. Сравнительная оценка эффективности совершенствованной ассоциированной вакцины с коммерческими моновакцинами против ЧМЖЖ и ОО.
7. Проведение комиссионных испытаний для оценки технологии изготовления, а также иммунобиологических свойств ассоциированной вакцины, оформление и утверждение нормативно-технической документации (НТД).

Научная новизна работы:

Впервые штамм НИСХИ вируса ОО адаптирован к перевиваемой линии клеток Vero. Установлено, что штамм НИСХИ вируса ОО сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции на перевиваемой линии клеток Vero.

Впервые в РК разработана технология изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО, с использованием живых аттенуированных штаммов Nigeria 75/1 вируса ЧМЖЖ и НИСХИ вируса ОО.

Впервые продемонстрирована возможность ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО формировать у 6-12 мес. овец, протективный комбинированный иммунный ответ против ЧМЖЖ и ОО длительностью 12

мес., при этом у вакцинированных овец отмечалось 100% клиническая и вирусологическая защита от эпизоотического вируса ЧМЖЖ в течение 12 мес.

Практическая значимость полученных результатов. На основании результатов проведенных исследований разработана улучшенная технология изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО из аттенуированных штаммов Nigeria 75/1 и НИСХИ соответственно, репродуцированных на перевиваемой линии клеток Vero. Разработанная технология позволила получить безвредную, высокоиммуногенную и эффективную ассоциированную вакцину против ЧМЖЖ и ОО для МРС. Разработана и утверждена НТД на вакцинный препарат.

Экономическая значимость полученных результатов. Принимая во внимание пагубное влияние вирусов ЧМЖЖ и ОО на продуктивность мясного стада, снижение жизнеспособности и репродуктивной функции, повреждения кожи и шерсти и др. экономический эффект от будущего использования ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО очень велик.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Оптимизация параметров роллерного культивирования ЧМЖЖ и ОО в перевиваемой клеточной линии Vero.

2. Сравнительная оценка способов получения ассоциированной суспензии вирусов ЧМЖЖ и ОО для конструирования вакцины.

3. Оценка иммунобиологических свойств усовершенствованной ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО на естественно восприимчивых животных.

4. Оценка иммуногенной эффективности ассоциированной вакцины по сравнению с коммерческими моновалентными вакцинами против ЧМЖЖ и ОО.

Личный вклад соискателя. Все части диссертационной работы были выполнены при непосредственном участии автора. В выполнении определенных этапов работы, связанных с оценкой иммунобиологических свойств разработанной вакцины принимали участие магистр биологии Таранов Д. С., PhD. Жугунисов К. Д., к.б.н. Ершебулов З. Д., за что автор выражает им глубокую благодарность.

Апробация результатов исследований. Основные материалы диссертации доложены на международной научной конференции «Актуальные проблемы современной науки – 2021» (Нур-Султан, 2021), международной научной конференции «Теория и практика ветеринарной фармации, экологии и токсикологии в АПК» посвящённой 100-летию кафедры фармакологии и токсикологии СПбГУВМ (Санкт-Петербург, 2021), международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии,

биотехнологии, экологии и биобезопасности» посвящённой 80-летию заслуженного ученого, профессора В. Л. Зайцева (пгт Гвардейский, 2015).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. Результаты исследования по теме диссертации отражены в 13 научных работах, в том числе в 2 статьях, опубликованных в рецензируемых международных журналах, включенных в базу данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Содержание диссертационной работы состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Результаты собственных исследований и их обсуждение, Выводы, а также Приложения. Список использованных источников состоит из 218 наименований отечественной и зарубежной литературы. Материалы работы иллюстрированы 6 таблицами и 49 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении раскрыта актуальность научной работы, изложена исследуемая проблема и необходимость ее решения, путем усовершенствования методов, используемых в процессе изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО.

В главе 1 «Обзор литературы» представлены сведения зарубежной и отечественной литературы, касающиеся предыстории и особенностей заболеваний. Описаны преимущества и недостатки доступных методов диагностики ЧМЖЖ и ОО. Представлен анализ эпизоотической ситуации по ЧМЖЖ и ОО в мире. Описаны меры борьбы с болезнями и дана краткая информация о специфических средствах против ЧМЖЖ и ОО. Приведены литературные данные о биосистемах, чувствительных к вирусу ЧМЖЖ и ОО.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» приведены объекты исследования, охарактеризованы материалы, реактивы, оборудования. Представлены методы исследования научных работ и статистические методы анализа.

Объектами исследования являлись вирус ЧМЖЖ, вирус ОО, МРС, клеточная линия Vero, ассоциированная вакцина.

Предмет исследования

1. Культуральные свойства вируса ЧМЖЖ и ОО.
2. Способы приготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО.
3. Эффективность и иммунобиологические свойства разработанной ассоциированной вакцины на целевых животных.

Методы исследования

Культивирование вируса ЧМЖЖ и ОО проводили роллерным методом в перевиваемой культуре клеток Vero. Культуру клеток инфицировали вирусами ЧМЖЖ и ОО в дозах 0,01 и 0,1 ТЦД₅₀/кл соответственно. В качестве поддерживающей среды использовали среду ДЕМ, с содержанием 2% инактивированной сыворотки КРС и 1% глутамина. Вирусы инкубировали при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Составление вакцины. Стерильные суспензии вируса ЧМЖЖ и ОО объединяли в соотношении 1:1 (в равных антигенных нагрузках). В ассоциированную суспензию добавляли, предварительно охлажденный до $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$, защитный раствор (пептон-сахароза) в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД и стрептомицин 0,5 г-на 1 дм³ смеси. Содержимое сосуда тщательно перемешивали и разливали в стерильные ампулы по 2,0 см³с помощью дозирующего шприц - автомата.

Безопасность вакцины проверяли на овцах 6-12 мес. возраста, доставленных из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям и серонегативных к вирусам ЧМЖЖ и ОО, а также на лабораторных животных (кролики и белые мыши). Экспериментальных животных вакцинировали методом подкожного введения. При этом овцам вакцину вводили в объеме 5,0 см³, кроликам по 1,0 см³ и белым мышам 0,1 см³. По результатам исследования, экспериментальные животные (овцы, кролики, белые мыши) должны быть живы и физиологическое состояние животных должно соответствовать клинически здоровым животным.

Иммуногенность вакцины оценивали на овцах в возрасте 6-12 мес, доставленных из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям и серонегативных к вирусам ЧМЖЖ и ОО. Овец опытной группы иммунизировали подкожно однократной дозой ($10^{3,0}$ ТЦД₅₀/мл) вакцины в объеме 2,0 см³. Животных контрольной группы оставили не привитыми.

За всеми иммунизированными и контрольными животными наблюдали в течение 360 дней, и на 7, 14, 21, 30, 90, 180, 270 и 360 дни были взяты сыворотки крови для исследования на наличие антител в РН и ИФА. Для контроля вирусной нагрузки в течение 14 дней брали мазки (назальные, конъюнктивальные, оральные и ректальные), а также образцы крови, которые анализировали с помощью ПЦР-тест-систем.

Контрольные тестирования были проведены на 7, 14, 21, 30, 90, 180, 270 и 360 дни вакцинации с использованием вирулентного штамма Кентау-7 вируса ЧМЖЖ (в дозе $1,0 \times 10^{5,0}$ ТЦД₅₀/мл) и штамма А вируса ОО (в дозе $1,0 \times 10^{4,5}$ ТЦД₅₀/мл). При проведении контрольных испытаний обе группы (вакцинированные и не вакцинированные овцы) животных были разделены

на подгруппы I(a) и I(b)) и II(a) и II(b)), поскольку в испытаниях использовались два контрольных штамма.

За инфицированными животными наблюдали в течение 14 дней с ежедневным измерением ректальной температуры и выявлением клинических признаков рака молочной железы и ОО, которые впоследствии оценивались с использованием балльных систем, описанных ранее (Z. Vamouh et al., 2019, J. Hamdi et al., 2021). Кроме того, в течение 14 дней у инфицированных овец брали мазки (из носа, конъюнктивы, полости рта и прямой кишки), а также образцы крови и анализировали методом ПЦР для оценки вирусной нагрузки.

Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism версии 8.0.1. Средние значения температуры тела животных, серологические данные, клинические оценки рассчитывались с вычетом стандартной ошибки среднего значения. Значимость всех опубликованных значений была не ниже порогового значения по первому критерию ($P < 0,05$).

В главе 3 «Результаты собственных исследований» представлены результаты проведенных экспериментальных исследований по теме диссертационной работы.

В ходе работы по адаптации штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero было проведено 10 последовательных пассажей. Результаты представлены на рисунке 1.

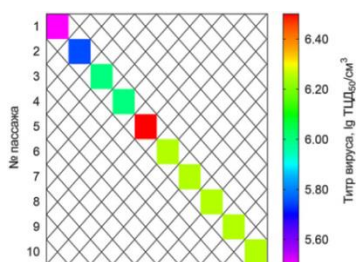


Рис. 1. Динамика накопления штамма НИСХИ в культуре клеток Vero в зависимости от уровня пассирования.

На основании полученных результатов исследований для последующих экспериментов использовали вирусосодержащий материал (ВСМ), полученный на 5-м пассаже, с титром вируса ОО $6,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При исследовании образца ВСМ 5-го пассажа методом ПЦР на наличие ДНК вируса ОО оказалось, что она специфична для вируса ОО.

В следующей серии экспериментов ВСМ ОО (100 см^3) 5-го пассажа объединяли с комбинацией защитной среды пептон-сахароза (в конечной

концентрации 5%-3% соответственно) и высушивали методом лиофилизации. В результате был получен стерильный лиофилизированный штамм НИСХИ, с биологической активностью 6,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Штамм НИСХИ вируса ОО, адаптированный к перевиваемой культуре клеток Vero, оказался безвредным и ареактогенным для овец при подкожном введении вируса 3 овцам в дозе $2,0 \times 10^{5,0}$ ТЦД₅₀. Ректальная температура у иммунизированных овец была в пределах нормы.

При оценке иммуногенности штамма НИСХИ экспериментальные группы овец (3 группы по 3 гол. овец в каждой) были иммунизированы испытуемым штаммом в дозе $1,0 \times 10^{3,0}$ ТЦД₅₀/см³. Через 7, 14 и 21-е сут после введения штамма НИСХИ в экспериментальных группах животных титр вируснейтрализующих антител (ВНА) к гомологичным агентам находился в диапазоне 1,8-4,33 log₂. В крови контрольных групп овец (3 группы по 2 гол. овец в каждой) антитела к вирусу ОО отсутствовали.

В результате контрольного заражения обеих групп овец вирулентным штаммом А вируса ОО установлено, что овцы опытной группы проявляют устойчивость к вирусу ОО в течение 14 сут (срок наблюдения), тогда как не вакцинированные овцы заболели с проявлением клинических признаков ОО.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что штамм НИСХИ сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции в перевиваемой линии клеток Vero.

Выбор оптимальных параметров репродукции вирусов ЧМЖЖ и ОО в культуре клеток Vero-роллерным методом

Оценку репродуктивных свойств вирусов ЧМЖЖ и ОО в зависимости от множественности иницирующей дозы проводили путем инокуляции линию клеток Vero, выращенные в пробирках, этими вирусами с множественностью от 0,001 до 1,0 ТЦД₅₀/кл. Инкубацию вирусов проводили в термостат с постоянной температурой ($37 \pm 0,5$) °C на 7-10 сут.

В результате исследований максимальное накопление вируса ЧМЖЖ ($6,67 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) при роллерном культивировании отмечалось при инфицирующей дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл, тогда как наибольшая активность вируса ОО ($6,42 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) была отмечена при инфицирующей дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл.

Длительность культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО определяли путем культивирования этих вирусов в течение 1-10 сут при температуре ($37 \pm 0,5$) °C с последующим определением инфекционной активности вирусов ЧМЖЖ и ОО методом микротитрования в культуре клеток Vero.

В результате проведенной работы максимальный выход вируса ЧМЖЖ ($6,50 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) наблюдался на 4-5 дни культивирования, тогда как наиболее высокий выход вируса ОО был отмечен на 5-6 дни культивирования ($6,25 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Влияния концентрации сыворотки крови КРС на размножение вирусов ЧМЖЖ и ОО изучали путем культивирования этих вирусов с использованием предварительно приготовленных поддерживающих сред, содержащих различные концентрации (0,5%; 1,0%; 2,0%) сыворотки крови КРС. В результате проведенных исследований наибольшее накопление вирусов ЧМЖЖ и ОО (6,50 lg ТЦД₅₀/см³ и 6,17 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно) наблюдалось при культивировании вирусов с использованием поддерживающей среды, содержащей 2,0% сыворотки крови КРС.

Таким образом, определены оптимальные параметры роллерного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО при раздельном культивировании в культуре клеток Vero. При этом оптимальная доза заражения вирусов ЧМЖЖ и ОО составила 0,01 и 0,1 ТЦД₅₀/кл соответственно; срок культивирования вирусов составила 4-5 и 5-6 сут соответственно; оптимальная концентрация сыворотки в составе поддерживающей среды составила 2,0%.

Изучение репродуктивных свойств вирусов ЧМЖЖ и ОО при совместном культивировании в культуре клеток Vero и выявления наличия интерференции между вирусными агентами

Взаимодействие вакцинных штаммов Nigeria 75/1 и НИСХИ вируса ЧМЖЖ и ОО соответственно, изучали в перевиваемой культуре клеток Vero путем их совместного культивирования одномоментным и интервальным внесением вирусов в систему с равной множественностью заражения (0,01 ТЦД₅₀/кл).

В результате раздельного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО в биосистеме в течение 5 и 6 сут, соответственно, биологическая активность вирусов достигла до 6,42 lg ТЦД₅₀/см³ и 6,08 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Одновременное ведение вирусов в биосистему в соотношении 1:1 привело к снижению титра вируса ЧМЖЖ и ОО до 5,50 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,83 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. При этом продолжительность культивирования вирусов составляла 6-7 сут. При раздельном введении вируса ЧМЖЖ, а затем вируса ОО с интервалом 3 сут в биосистему титр инфекционной активности вирусов также снизились до 5,17 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,50 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно, при этом период культивирования вирусов увеличился до 9 сут.

В последующих исследованиях с помощью электронного микроскопа определяли наличие интерференции между вирусными агентами при совместном культивировании в одной биосистеме. Результаты электронно-микроскопических исследований представлены на рисунке 2 (А, В, С)).

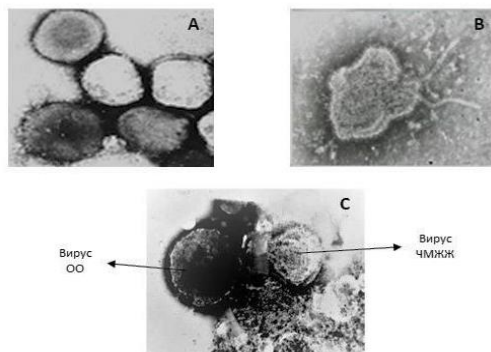


Рис. 2. Электронная микроскопия вирусов ЧМЖЖ и ОО. Увеличение с отрицательным контрастом $\times 100\,000$. (А) вирус ОО; (В) вирус ЧМЖЖ; (С) смесь вирусов ЧМЖЖ и ОО

В результате электронно-микроскопических исследований в отобранных образцах вируссодержащей (ВСС) ЧМЖЖ и ОО, а также в образцах ассоциированных суспензии ЧМЖЖ и ОО не были обнаружены дефектные интерферирующие частицы, что указывала на возможность совместного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО в одной биосистеме.

Выбор оптимальных параметров репродукции вирусов ЧМЖЖ и ОО при совместном культивировании в культуре клеток Vero роллерным методом

С целью определения влияния множественности заражения на биологическую активность вируса ЧМЖЖ и ОО, культуру клеток Vero, выращенную в роллерных сосудах, одновременно инфицировали указанными вирусами в дозах $1,0 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$; $0,1 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$; $0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$; $0,001 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ и культивировали при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ со сменой среды через 2 сут. Инкубацию вирусов приостановили при разрушении клеток вирусами на 85-90%.

В результате исследований максимальный выход вирусов ЧМЖЖ и ОО ($5,75 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $6,08 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно) был отмечен при заражении культуры клеток Vero в дозе $0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$.

Длительность совместного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО определяли путем одновременного инфицирования биосистемы этими вирусами в дозе $0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ соответственно и культивировали при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ со сменой среды через 2 сут. В результате было установлено, что длительность совместного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО в клеточной линии Vero составляет 6-7 сут.

Сравнительная оценка способов получения ВСС ЧМЖЖ и ОО в культуре клеток Vero

Для проведения исследований по ранее отработанным параметрам раздельного и совместного культивирования вирусов ЧМЖЖ и ОО в культуре клеток Vero нарабатывали ВСС этих вирусов. В результате проведенных работ установлено что, активность вируса ЧМЖЖ и ОО в ВСС, полученных раздельным культивированием двух вирусов, была выше ($6,67 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $6,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) по сравнению с титром ($5,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,83 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) суспензии, полученной при совместном культивировании этих вирусов.

Наработка ВСС ЧМЖЖ и ОО для изготовления экспериментальной ассоциированной вакцины

Наработку ВСС ЧМЖЖ и ОО проводили раздельным культивированием вирусов ЧМЖЖ и ОО в культуре клеток Vero. В результате проведенных работ были наработаны стерильные ВСС ЧМЖЖ и ОО с биологической активностью $6,67 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $6,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

Изучение свойств различных стабилизирующих сред для составления экспериментальных образцов ассоциированной вакцины

Для приготовления экспериментальных образцов ассоциированной вакцины, часть ранее приготовленных ВСС ЧМЖЖ и ВСС ОО объединяли 1:1. Полученную ассоциированную суспензию аликвотировали по 100 см^3 и объединяли с различными комбинациями стабилизирующих сред (6 прописей) в равных объемах (1:1) и высушивали методом сублимации. По разнице в титрах исходного и высушенного материалов судили о протективных свойствах тестируемых сред (рис. 3. А и В).

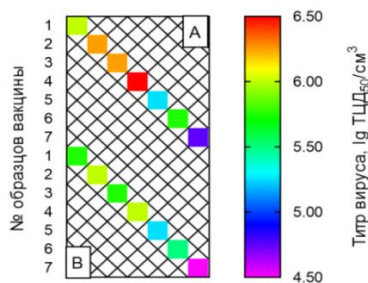


Рис. 3. Протективность тестируемых сред после лиофилизации (n=3)
(А) – титры вируса ЧМЖЖ после лиофилизации образцов вакцины; (В) – титры вируса ОО после лиофилизации образцов вакцины.

В ходе проведенной работы было установлено, что при лиофилизации образец вакцины № 4, содержащий комбинацию пептона (5%) и сахарозы (3%), обладает наилучшими защитными свойствами.

Изучение сохраняемости экспериментальной вакцины при кратковременном и длительном хранении

Защитные свойства стабилизирующих сред изучали при хранении образцов вакцины в следующих температурно-временных режимах: (35-37) °C, (20-22) °C в течение 5 и 7 сут соответственно, а также при температурах (2-8) °C и (-20) °C в течение 12 мес. Степень снижения активности оценивали по разнице в титре в исходном и хранящемся материале. Результаты представлены на рисунке 4, 5 (А, В) и 6. (А, В).

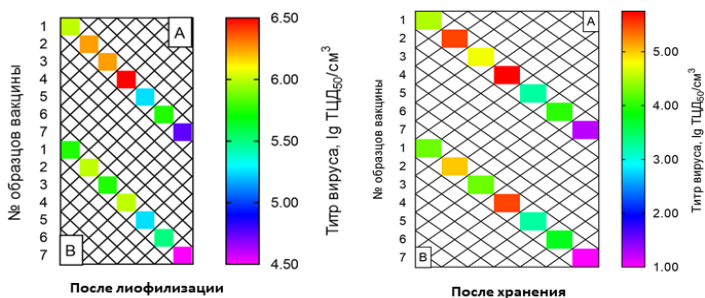


Рис. 4. Сохраняемость образцов ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО при температуре (35-37) °C (n=3). (А) – титры вируса ЧМЖЖ после лиофилизации и хранения образцов вакцины; (В) – титры вируса ОО после лиофилизации и хранения образцов вакцины.

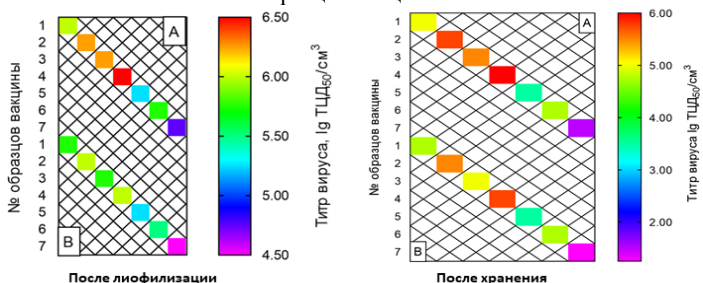


Рис. 5. Сохраняемость образцов ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО при температуре (20-22) °C (n=3). (А) – титры вируса ЧМЖЖ после лиофилизации и хранения образцов вакцины; (В) – титры вируса ОО после лиофилизации и хранения образцов вакцины.

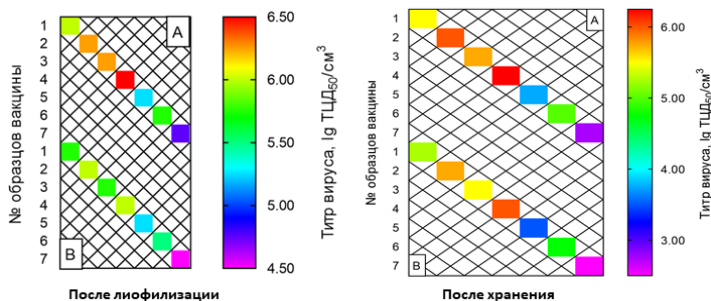


Рис. 6. Сохраняемость образцов ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО при температуре плюс (2-8) °С (n=3). (А) – титры вируса ЧМЖЖ после лиофилизации и хранения образцов вакцины; (В) – титры вируса ОО после лиофилизации и хранения образцов вакцины.

В результате проведенных исследований установлено, что при кратковременном хранении образцов ассоциированной вакцины при температурах (35-37) °С, (20-22) °С в течение 5 и 7 сут, соответственно образец вакцины № 4, содержащий комбинацию защитных сред пептона (5%) и сахарозы (3%), обладал наилучшими защитными свойствами. Термостабильность данного образца вакцины составляла 5 сут при температуре плюс (35-37) °С и 7 сут при (20-22) °С.

При хранении образцов ассоциированной вакцины в течение 12 мес. при температуре плюс (2-8) °С потеря вируса ЧМЖЖ и ОО отмечалась во всех образцах вакцины, кроме образца № 4, тогда как при температуре хранения (-20) °С снижения активности вирусов ЧМЖЖ и ОО не наблюдались.

Приготовление экспериментально-лабораторных серий ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО

Были приготовлены 3 опытно-экспериментальные серии ассоциированной вакцины с активностью вирусов ЧМЖЖ и ОО 6,33 и 6,00 lg TCID₅₀/cm³ соответственно. Высушенные ассоциированные вакцины были в виде однородных таблеток от бежевого до светло-коричневого цвета.

Приготовленные экспериментальные образцы ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО были стерильными, растворялись в течение 60 сек. в физиологическом растворе, средний показатель рН вакцин составлял 7,2, массовая доля влаги в вакцинах составляла 4%.

Оценка безопасности и реактогенности экспериментальной ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО

Подкожное введение экспериментальной ассоциированной вакцины овцам, кроликам и белым мышам в дозах 125 000 TCID₅₀, 25 000 TCID₅₀ и 2500

ТЦД₅₀ соответственно не вызывает у животных признаков отклонения от физиологической нормы в течение 10-14 сут, что свидетельствует о безвредности разработанной вакцины.

Определение оптимальной иммунизирующей дозы экспериментальной ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы (ИмД) использовали 3 образца экспериментальной ассоциированной вакцины с различными иммунизирующими дозами $10^{2,0}$; $10^{3,0}$ и $10^{4,0}$ ТЦД₅₀, которых ввели 3-м группам животных. Оптимальную ИмД ассоциированной вакцины определяли на основе определения 50%-ой ИмД₅₀ вакцины. Результаты исследования представлены на рисунке 7.

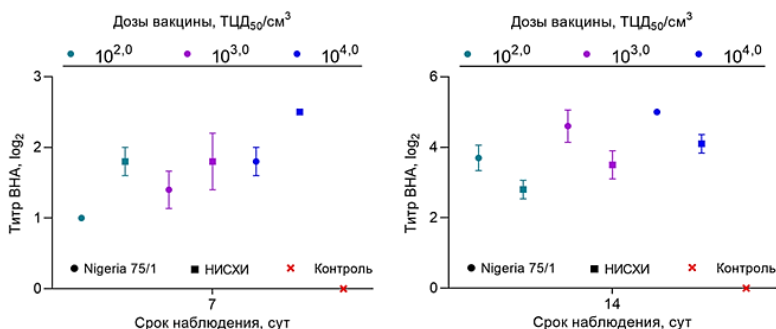


Рис. 7. – Определение ИмД₅₀ ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО

В результате исследований была определена оптимальная ИмД вакцины, которая составила $10^{3,0}$ ТЦД₅₀/см³ для вируса ЧМЖЖ и ОО.

Определение сроков формирования и длительности иммунитета у вакцинированных животных

Для определения иммуногенности ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО использовали 32 гол. овец, которых подкожно иммунизировали данной вакциной в дозе $10^{3,0}$ ТЦД₅₀/мл.

В результате серологических исследований 100% защитные титры ВНА были обнаружены на 21-й день вакцинации, при этом средние титры ВНА к вирусу ЧМЖЖ и ОО достигли до 6,8 log₂ и 5,5 log₂ соответственно. У контрольных групп овец в сыворотках крови антитела к обоим вирусам отсутствовали (рис. 8).

Анализ дополнительных исследований сывороток крови иммунизированных овец на наличие антител к вирусу ЧМЖЖ в ИФА показал, что овцы, опытной группы на 21-й день вакцинации были на 100%

защищены от эпизоотического вируса ЧМЖЖ, поскольку среднее значение S/N снизилось до 17%. Подробные результаты исследования представлены на рисунке 8.

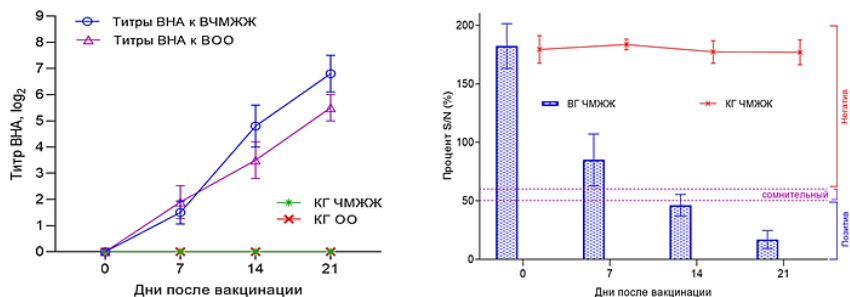


Рис. 8. Накопление антител у овец опытной и контрольной групп после иммунизации ассоциированной вакциной.

Пик среднего титра ВНА (7,2 log₂) к вирусу ЧМЖЖ в сыворотках крови иммунизированных овец был обнаружен на 30 день вакцинации. Указанный титр ВНА сохранялся до 360 дня вакцинации с небольшими колебаниями ($P \geq 0,05$) (Рис. 9).

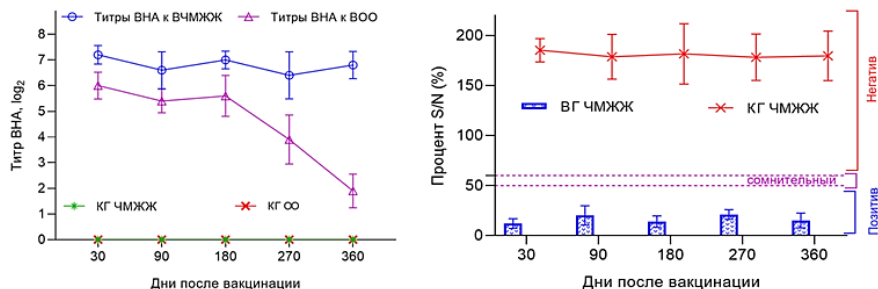


Рис. 9. Длительность сохранения выработанных антител у овец опытной и контрольной групп после иммунизации ассоциированной вакциной.

Пик среднего титра ВНА (6,00 log₂) к вирусу ОО у вакцинированных овец отмечался через месяц после вакцинации. Выработанные на 30 день вакцинации ВНА сохранялись в течение 6 мес. с незначительными колебаниями ($P \geq 0,05$). Далее наблюдался устойчивое снижение титра антител к вирусу ОО, и к концу опыта (через 360 дней) уровень антител составила 1,9 log₂ (см. рис. 9.).

Исследование сывороток крови вакцинированных животных методом конкурентного ИФА (с-ELISA) показало защиту всех вакцинированных животных от вируса ЧМЖЖ до конца исследования (360 дней) (см. рис. 9.).

При тестировании устойчивости привитых овец к контрольному заражению вирулентными вирусами ЧМЖЖ и ОО, вакцинированные овцы не проявляли клинических симптомов данных болезней, и их ректальная температура была в пределах нормы. У всех инокулированных контрольными вирусами овец наблюдались клинические признаки, характерные для вируса ЧМЖЖ и ОО.

В результате проведенных исследований установлено, что разработанная ассоциированная вакцина при однократной иммунизации овец в дозе $10^{3,0}$ ТЦД₅₀/мл вызывает напряженный иммунитет с 7-го дня против ОО и с 14-го дня против ЧМЖЖ продолжительностью до 1 года. При этом у вакцинированных овец 100% защитный иммунитет к вирусу ЧМЖЖ сохраняется в течение 12 мес.

Сравнительная оценка эффективности экспериментальной ассоциированной вакцины и моновакцин против ЧМЖЖ и ОО

В ходе научно-исследовательской работы были созданы 3 опытные группы по 9 гол. овец и 2 контрольные группы по 6 гол. овец в каждой. Первая группа овец была вакцинирована моновалентной вакциной против ЧМЖЖ, вторая группа - моновалентной вакциной против ОО и третья группа - ассоциированной вакциной против ЧМЖЖ и ОО. Иммунизацию проводили подкожно в дозе $10^{3,0}$ ТЦД₅₀/см³. Контрольное заражение проводили через 1, 2 и 3 мес. после вакцинации.

Эффективность вакцин оценивали по способности вакцинированных животных противостоять заболеванию при заражении контрольными вирусами ЧМЖЖ и ОО, а также по уровню накопления ВНА в сыворотках крови привитых животных (рис.10 и 11).

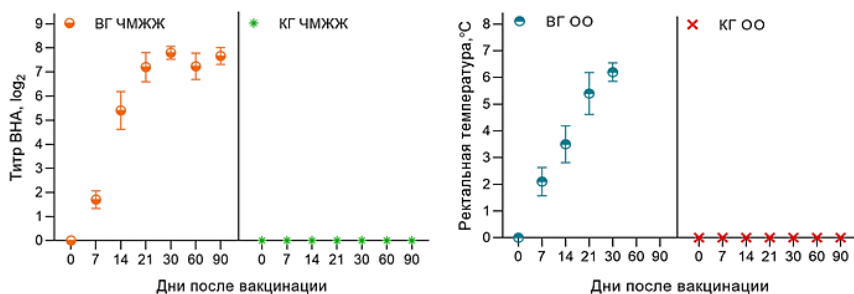


Рис. 10. Динамика образования ВНА у овец, иммунизированных моновакциной против ЧМЖЖ ОО.

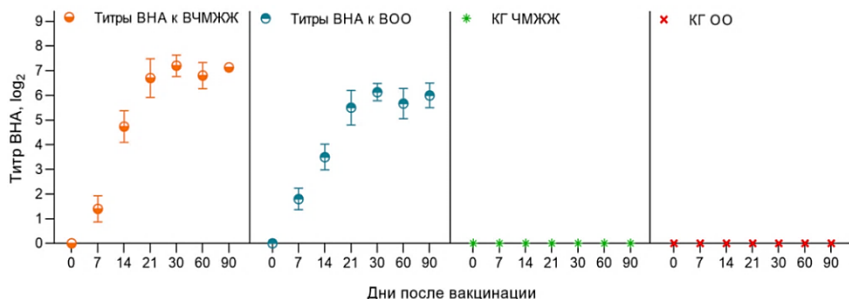


Рис. 11. Формирования антител у овец, иммунизированных ассоциированной вакциной против ЧМЖЖ.

Результаты контрольных испытаний показали, что все иммунизированные животные опытных групп проявляют устойчивость к контрольным вирусам ЧМЖЖ и ОО в течение 14 сут (срок наблюдения).

В результате проведенных исследований было установлено, что разработанная ассоциированная вакцина, по иммуногенности не уступает коммерческим моновалентным вакцинам против этих инфекций, являясь при этом более выгодным средством профилактики против ЧМЖЖ и ОО.

Завершающим этапом цикла лабораторных исследований, нацеленных на разработку ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО, было проведение комиссионных испытаний вакцины для оценки физических и иммунобиологических свойств, а также технологии изготовления в условиях пилотного производства. (Приказ Генерального директора НИИПББ № 10п от 31.01.2014 г.)

Разработанная технология изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО полностью отвечает требованиям проекта представленной в НТД.

ВЫВОДЫ

1. Штамм НИСХИ вируса ОО был адаптирован к перевиваемой линии клеток Vero и определены его иммунобиологические свойства.
2. Определены условия роллерного культивирования вируса ЧМЖЖ и ОО в клеточной линии Vero;
3. Усовершенствована технология приготовления ассоциированной суспензии вирусов ЧМЖЖ и ОО и изготовлены экспериментальные серии вакцины;
4. Установлено, что приготовленная ассоциированная вакцина безвредна и ареактогенна для овец, кроликов и белых мышей. Иммуитет у животных, привитых ассоциированной вакциной, формируется против

ЧМЖЖ на 14 сут., против ОО на 7 сут после вакцинации длительностью 12 мес. При этом у привитых животных защитные титры антител к вирусу ЧМЖЖ сохранялись до 12 мес.

5. Разработанная ассоциированная вакцина против ЧМЖЖ и ОО сохраняет стабильность при (2-8) °С в течение 12 мес.

6. Установлено, что ассоциированная вакцина, приготовленная по усовершенствованной технологии, не уступает по иммуногенности коммерческим моновалентным вакцинам против ЧМЖЖ и ОО, являясь при этом более эффективным средством профилактики.

7. Проведены комиссионные испытания технологии изготовления, физических и иммунобиологических свойств ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО, по результатам которых был разработан и утвержден НТД на вакцинный препарат.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Усовершенствованную технологию изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО предлагается использовать в биологической промышленности для приготовления безвредной и эффективной вакцины для МРС.

Разработан и утвержден комплект НТД на вакцинный препарат, включающий:

1. Стандарт организации на вакцинный препарат СТ 405-1919-04 ГП-083-2014. Ассоциированная вакцина против чумы мелких жвачных животных и оспы овец.

2. Временная инструкция по изготовлению и контролю ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец.

3. Временное наставление по применению ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Пат. № 28903 Казахстан, МПК: А61К 39/12, С12Н 7/00. Способ изготовления ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / А.Р. Сансызбай, К.Б. Баракбаев, Е.О. Абдураимов, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондибаева, Д.С. Таранов, З.Д. Ершебулов, Ж.Т. Аманова, Ж.Ж. Саметова; Гвардейский. НИИПББ. – 2013/1283.1; заявл. 30.09.2013; опубл. 15.09.2014, Бюл. № 9. – 3 с. : ил.

2. Аманова, Ж.Т. Оценка эффективности ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Аманова Ж.Т.,

Таранов Д.С., Ершебулов З.Д. [и др.] // Ветеринария. – 2016. – № 9. – С. 21-23.

3. Аманова, Ж.Т. Безопасность и реактогенность ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Аманова Ж.Т., Таранов Д.С., Жугунисов К.Д. [и др.] // Наука и Образование. – 2019. – № 1(54). – С. 234-240.

4. Аманова, Ж.Т. Иммуногенность ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Аманова Ж.Т., Таранов Д.С., Жугунисов К.Д. [и др.] // Известия ВУЗов Кыргызстана. – 2019. – № 7. – С. 94-98.

5. Аманова, Ж.Т. Оценка эффективности стабилизирующих сред при лиофилизации и хранении ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Аманова Ж.Т., Жугунисов К.Д., Булатов Е.А. [и др.] // Известия НАН КР. – 2020. – № 2. – С. 25-34.

6. Аманова, Ж.Т. Возможность совместного культивирования вирусов чумы мелких жвачных животных и оспы овец и выявление наличия интерференции между вирусными агентами [Текст] / Аманова Ж.Т., Жугунисов К.Д., Булатов Е.А. [и др.] // Биологические науки Казахстана. – 2020. – № 3. – С. 103-110.

7. Пат. на полезную модель № 6883 Казахстан, МПК: А61К 39/295 А61Р 31/00. Способ получения ассоциированной биомассы вирусов чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Ж.Т. Аманова, К.Б. Баракбаев, К.Д. Жугунисов, Е.А. Шаяхметов, Е.А. Булатов, Е.О. Абдураимов, К.Д. Закарья; Гвардейский. НИИПББ. – 2021/0624.2; заявл. 22.06.2021; опубл. 24.06.2022.

8. Amanova, Z. Duration of protective immunity in sheep vaccinated with a combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox [Text] / Z. Amanova, K. Zhugunissov, K. Barakbayev [et all] // Vaccines. – 2021. – Vol. 9(8), 912.

9. Аманова, Ж.Т. Сроки формирование иммунитета у овец, вакцинированных ассоциированной вакциной против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Ж.Т. Аманова, К.Д. Жугунисов, К.Б. Баракбаев [и др.] // Биологические науки Казахстана. – 2021. – № 1. – С. 26-35.

10. Amanova, Z. Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: Capripoxvirus: Sheeppox virus) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties / Z. Amanova, Z. Sametova, Y. Bulatov [et all] // Voprosy Virusologii. – 2022. – Vol. 67(5). – P. 450-458.

Аманова Жанат Темирбаевнанын «Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинаны даярдоо технологиясын жакшыртуу» деген темада 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын алуу үчүн жазылган диссертациясынын кыскача

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосу, койлордун чечек оорусу, технология, профилактика, ассоцияланган вакцина, иммуногендүүлүк.

Изилдөөнүн объектиси: Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосу ылаңынын вирусу, койлордун чечек оорусу ылаңынын вирусу, майда мал, Vero клеткаларынын культурасы, ассоцияланган вакцина.

Изилдөөнүн предмети: Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосу жана койлордун чечек оорусу вирустарынын культуралдык касиеттери, майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинаны даярдоо, ассоцияланган вакцинанын коопсуздугу жана иммуногендик активдүүлүгү.

Иштин максаты: Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинаны даярдоо технологиясын жакшыртуу жана анын иммунобиологиялык касиетин баалоу.

Изилдөөнүн ыкмалары: биотехнологиялык, вирусологиялык, серологиялык жана иммунологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы: Биринчи жолу койлордун чечек оорусунун НИСХИ штаммы Vero клеткаларынын линиясына ылайыкташтырылган.

Казахстанда биринчи жолу майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосу вирусунун Nigeria 75/1 жана койлордун чечек оорусу вирусунун НИСХИ тирүү аттенуацияланган штаммдарын колдонуу менен майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинаны даярдоо технологиясы иштелип чыкты.

Биринчи жолу 6-12 айлык койлордо майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинанын аталмыш ооруларга каршы 12 айга созула турган протективдүү ассоциацияланган иммундук жоопту түзөтүү мүмкүнчүлүгү көрсөтүлдү. Дагы вакцинацияланган койлодо 12 ай бою майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосунун эпизоотиялык вирусунан 100% клиникалык жана вирусологиялык коргоо байкалган, бул койлордо майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосуна каршы вакцинациядан кийинки узак (1 жылдан ашык) иммунитеттин пайда болушун көрсөтөт.

Колдонуу боюнча сунуштар: Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоосу жана койлордун чечек оорусуна каршы ассоцияланган вакцинанын жакшыртылган даярдоо технологиясын майда мүйүздүү малдар үчүн коопсуз жана иммуногендик вакцина даярдоодо биологиялык өнөр жайда колдонуу сунушталат.

Колдонулуучу чөйрө: биотехнология, вирусология, ветеринария.

РЕЗЮМЕ

диссертации Амановой Жанат Темирбаевны на тему:
«Совершенствование технологии изготовления ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология

Ключевые слова: чума мелких жвачных животных, оспа овец, технология, профилактика, ассоциированная вакцина, иммуногенность.

Объект исследования: вирус чумы мелких жвачных животных, вирус оспы овец, мелкий рогатый скот, клеточная линия Vero, ассоциированная вакцина.

Предмет исследования: культуральные свойства вируса чумы мелких жвачных животных и оспы овец, составление ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец, безопасность и иммуногенная активность ассоциированной вакцины.

Цель работы: Совершенствование технологии изготовления ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец и оценка ее иммунобиологических свойств.

Методы исследования: биотехнологический, вирусологический, серологический и иммунологический.

Полученные результаты и их новизна: Впервые штамм НИСХИ вируса ОО адаптирован к перевиваемой линии клеток Vero.

Впервые в Казахстане разработана технология изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО, с использованием живых аттенуированных штаммов Nigeria 75/1 вируса ЧМЖЖ и НИСХИ вируса ОО и изучены её иммунобиологические свойства.

Впервые продемонстрирована возможность ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО формировать у 6-12 мес. овец, протективный комбинированный иммунный ответ против этих болезней длительностью 12 мес. В то же время вакцинированные овцы демонстрировали 100% клиническую и вирусологическую защиту от эпизоотического вируса ЧМЖЖ

в течение 12 мес., что свидетельствует о формировании у овец более длительного (более 1 года) поствакцинального иммунитета против ЧМЖЖ.

Рекомендации по использованию: Совершенствованную технологию изготовления ассоциированной вакцины против ЧМЖЖ и ОО предлагается использовать в биологической промышленности для создания безопасной и иммуногенной вакцины для мелкого рогатого скота.

Область применения: биотехнология, вирусология, ветеринария.

SUMMARY

Dissertation of the Amanova Zhanat on the title: “Improving the technology for manufacturing the combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox” for the degree of candidate of biological sciences in specialty 03.01.06 – Biotechnology

Key words: peste des petits ruminants, sheep pox, technology, prevention, combined vaccine, immunogenicity.

Object of the study: peste des petits ruminants virus, sheep pox virus, small cattle, Vero cell line, combined vaccine.

Object of the research: The cultural properties of the peste des petits ruminants and sheep pox viruses, preparation the combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox, safety and immunogenic activity of the combined vaccine.

Objective: Improving the technology for manufacturing the combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox and evaluation its immunobiological properties.

Research methods: biotechnological, virological, serological, and immunological.

The obtained results and their novelty: For the first time, the Niskhi strain of the SPP virus has been adapted to the transplantable Vero cell line.

For the first time in Kazakhstan, a technology was developed for manufacturing a combined vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox using the live attenuated PPRV strain Nigeria 75/1 and SPPV strain Niskhi and studied its immunobiological properties.

For the first time, the possibility of the combined vaccine against PPR and SPP to form a protective combined immune response for 12 months in sheep aged 6–12 months was demonstrated, at the same time, vaccinated sheep showed 100% clinical (according to the clinical signs of PPR, assessed by the score system) and virological (according to the titer of antibodies in the blood sera of immunized sheep) protection against epizootic PPRV for 12 months, what indicates the

formation of a longer (more than 1 year) post-vaccination immunity in sheep to the PPRV.

Recommendations for use: The improved manufacturing technology for the combined vaccine against PPR and SPP is proposed for use in the biotechnology industry to develop a safe and immunogenic vaccine for small cattle.

Applications: biotechnology, virology, veterinary medicine.