

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

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

Диссертационный совет Д.06.16.538

На правах рукописи
УДК 619:616.9:578.57.083.13

Абдураимов Ергали Орынбасарович

**ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН И
ИММУНОПРОФИЛАКТИКА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ
ЖИВОТНЫХ И КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ**

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

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени доктора ветеринарных наук

Бишкек – 2016

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН Республики Казахстан и в Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии имени А. Дуйшеева.

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

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Арбаев Кубан Султанович

доктор ветеринарных наук, профессор
Абуталип Аспен Абуталипулы

доктор ветеринарных наук
Мурватуллоев Сангимурод Акобирович

Ведущая организация: Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики

Защита диссертации состоится «23» декабря 2016 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета Д.06.16.538 при Кыргызском национальном аграрном университете им. К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О.Медерова, 68.

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

Автореферат разослан "19" декабря 2016 г.

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

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Инфекционные особо опасные заболевания животных, к которым относятся ящур, оспа овец, болезнь Ауески, бешенство, сибирская язва, а также чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) и катаральная лихорадка овец (КЛЮ), являются актуальными и представляют опасность для Казахстана и Кыргызстана (Мамадалиев С. 2001, Раимбеков Д.Р. 2007, Нургазиев Р.З., 2008, Джапаралиев Н.Т., 2011, Акматова Э.К., 2013, Абдыкеримов К.А., 2014, Кошеметов Ж., 2015,) из-за возможности их трансконтинентального распространения.

Чума мелких жвачных животных – вирусное контагиозное заболевание овец и коз, характеризующееся септическим поражением, катаральным или геморрагическим поражением слизистых оболочек. Учитывая высокую актуальность ЧМЖЖ, в сентябре 2014 г. в Риме (Италия) на 24 сессии Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) была принята Глобальная программа искоренения инфекции. Также в апреле 2015 года на Международной конференции «Борьба с чумой мелких жвачных и ее искоренение» в г.Абиджан, Кот-д'Ивуар, представители ФАО, Всемирной организации охраны здоровья животных (МЭБ) и др. стран, приняли резолюцию о глобальном плане по ликвидации ЧМЖЖ к 2030 году.

ЧМЖЖ актуальна и для Республики Казахстан, так первая вспышка среди овец и коз отмечена в 2003 г. в Южно-Казахстанской области. При проведении клинических, эпизоотологических и серологических исследований выделен вирус ЧМЖЖ (депонирован штамм «Кентау-7»). Благодаря принятым комплексным мерам ветеринарной службы в короткие сроки удалось локализовать очаг и предупредить дальнейшее его распространение.

Инфекционная катаральная лихорадка овец (КЛЮ, блутанг, синий язык) – природно-очаговая болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, поражает жвачных животных. Среди животных инфекция распространяется посредством кровососущих насекомых из рода *Culicoides*. Вирус блутанга относится к семейству *Reoviridae*, роду *Orbivirus*, в который входят также вирусы болезни Ибараки и эпизоотической геморрагической болезни оленей. Наиболее сильно симптомы болезни проявляются у овец, восприимчив к заболеванию и человек.

Эпизоотологическая ситуация серьезно обострилась начиная с 1998г., когда эпизоотия блутанга во многих странах Европы вызвала необходимость создания новой стратегии борьбы с заболеванием в масштабах мира. Стандарты МЭБ по блутангу также были пересмотрены, помимо этого в Наземный кодекс была включена новая глава, посвящённая надзору за блутангом.

В 2008 году в ежегодном отчете России, подаваемом в МЭБ, было указано об обнаружении в Белгородской, Калужской, Курской, Липецкой, Ярославской областях и Ставропольском крае, вспышки болезни у крупного

рогатого скота. В 2009 г., вспышки болезни были выявлены в Калужской, Нижегородской и Калининградской областях. В 2010-2011 гг. было заявлено о вспышке блутанга у крупного рогатого скота в Калужской области, Красноярском крае, Нижегородской и Смоленской областях.

Первые сведения о наличии серопозитивных животных в Казахстане сообщил Lundervold M. с соавт в середине 2004 г. В 2007-2008 гг. в литературе появились сообщения о наличии инфекции в Монголии. В 2014 году турецкие ученые выявили антитела к вирусу блутанга у яков Иссык-кульской области Кыргызской Республики, что показывает наличие природного очага инфекции.

Основными методами борьбы с указанными инфекциями является вакцинация, а появление новых вариантов и серотипов требует постоянного совершенствования технологии приготовления средств профилактики и диагностики для эффективной борьбы. В мире существуют несколько видов вакцин (культуральные, эмбриональные, живые и инактивированные), которые применялись в отдельных странах. Однако, несмотря на усилия Международных организаций по охране здоровья животных, ЧМЖЖ и КЛО продолжают расширять ареал своего присутствия. Поэтому своевременной борьбы и локализации инфекции, а также предупреждения массового распространения были проведены исследования по разработке двух актуальных для региона вакцин.

Связь темы диссертации с крупными научными программами.

Научно-исследовательская работа по данной работе выполнялась в соответствии с тематическим планом лаборатории Технологии культивирования биопрепаратов Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности по программе: Ц 0252 «Организация производства и выпуск вакцин против вирусных инфекций сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей» на 2001-2005 гг., по проектам «Разработка и внедрение метода суспензионного культивирования и на микроносителях вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец» на 2006-2008 гг. (номер госрегистрации 0106РК00357), «Разработка высокоэффективных средств профилактики и диагностики катаральной лихорадки овец» на 2009-2011 гг. (номер госрегистрации 0109РК00450), «Разработка технологии изготовления живой бивалентной культуральной вакцины для профилактики катаральной лихорадки овец» на 2012-2014 гг. (номер госрегистрации 0112РК00306).

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось разработка технологии изготовления и организация производства вирусвакцины против чумы мелких жвачных животных и разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Подобрать чувствительные клеточные линии для культивирования вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец и выбрать технологически перспективные линии культур клеток, обеспечивающие максимальную репродукцию вирусов.

2. Разработать технологию получения вирусной биомассы в культурах клеток и технологических приемах наработки вирусов (стационарный, роллерный, суспензионный, на микроносителях).

3. Подобрать оптимальный состав стабилизирующих сред и отработать режим лиофильного высушивания вакцины против чумы мелких жвачных животных.

4. Провести сравнительную оценку эффективности инактивантов (формальдегид, ДЭИ, β -пропиолактон) и адьюванта (ГОО) в формировании иммунитета вакцины против катаральной лихорадки овец.

5. Разработать технологию изготовления бивалентной инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец 4 и 16 серотипов.

6. Получить аттенуированные варианты вируса катаральной лихорадки овец и исследовать их свойства.

7. Разработать технологию изготовления живой бивалентной вакцины против катаральной лихорадки овец 4 и 16 серотипов.

8. Изготовить и испытать в лабораторных условиях на животных экспериментальные серии вакцины против чумы мелких жвачных животных и инактивированной бивалентной вакцины против катаральной лихорадки овец.

9. Изготовить производственные серии вакцины против чумы мелких жвачных животных и инактивированной бивалентной вакцины против катаральной лихорадки овец и провести регистрацию для внедрения в ветеринарную практику Республики Казахстан.

10. Организовать производство и выпуск вакцины против чумы мелких жвачных животных для применения в профилактике заболевания.

Научная новизна работы. Впервые в Республике Казахстан из патологических материалов, взятых от животных в Республике Таджикистан выделены штаммы "RT/RIBSP-07/16" (16 серотип) и "Хуросон-07/4"(4 серотип) вируса катаральной лихорадки овец и изучены их иммунобиологические свойства. Изучено и экспериментально обосновано применение культур клеток в получении вирусной биомассы и технологически доказаны перспективность и целесообразность их использования в приготовлении вакцин. Технологически оценены, методы наработки вирусной биомассы различными способами (стационарный, роллерный, суспензионный и на микроносителях). Подобрано и обосновано применение стабилизирующих добавок при получении сухих вирусвакцин против ЧМЖЖ и КЛО методом лиофилизации.

Определены новые режимы инактивации вируса КЛО и предложены новые принципы конструирования моновакцин. Получены новые

аттенуированные штаммы вируса КЛЮ, изучены их иммунобиологические свойства. Предложены новые принципы составления живых вакцин использования адьюванта для приготовления инактивированной бивалентной вакцины против КЛЮ.

Впервые в Республике Казахстан разработаны технологии изготовления и внедрены в практику вакцины против чумы мелких жвачных животных и инактивированная бивалентная вакцина против катаральной лихорадки овец. Научная новизна полученных результатов подтверждена 12 патентами, выданными Национальным институтом интеллектуальной собственности Министерства юстиции Республики Казахстан (№№ 47015, 62933, 62953, 63328, 63206, 63303, 71194, 75805, 75810, 84457, 84534, 84542).

Практическая значимость полученных результатов. Выделенные штаммы "RT/RIBSP-07/16 и "Хуросон-07/4" вируса катаральной лихорадки овец используются в изготовлении биологических препаратов (вакцины, диагностикумы). Разработана технология изготовления сухой культуральной вакцины против ЧМЖЖ. Разработана технология изготовления бивалентной живой и инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец, соответствующие требованиям Всемирной организации охраны здоровья животных (ОИЕ), предъявляемым к вакцинам для наземных животных.

Проведены регистрационные испытания и внедрены вакцины против чумы мелких жвачных животных (СТ ДПП 3893436-031-2009, с перерегистрацией СТ 405-1919-04 МК-078-2013) и катаральной лихорадки овец (СТ 405-1919-04 МК-070-2011) в практику ветеринарии Республики Казахстан. Организовано производство и осуществляется выпуск вакцины против чумы мелких жвачных животных (регистрационное свидетельство № РК-ВП-1-2487-13).

Экономическая значимость полученных результатов. Разработка и внедрение в ветеринарную практику и ежегодное применение вакцины против чумы мелких жвачных животных позволило значительно улучшить эпизоотологическую обстановку, сократить заболеваемость и падеж животных. В период с 2005 по 2015 гг. по государственному заказу Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан изготовлено более 66 млн. доз вакцины против ЧМЖЖ.

Внедрение вакцины против катаральной лихорадки овец позволит проводить профилактические мероприятия, а в случае возникновения быстро локализовать вспышку инфекции. Себестоимость инактивированной бивалентной вакцины по разработанной технологии составляет 35 тенге (менее 10 центов США), что значительно ниже стоимости зарубежных вакцин.

Разработка и приготовление вакцин из местных штаммов позволит обеспечить лучшую иммуногенность и защиту животных от полевых вирусов. Наличие отечественных технологий важно в плане биологической

безопасности государства, для обеспечения независимости от импортных препаратов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

Предложена эффективная технология получения вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец в легко масштабируемых культурах клеток с использованием технологически эффективных приемов (стационарный, роллерный, суспензионный, на микроносителях), позволяющие наработать вирусную биомассу пригодную для изготовления вакцины и диагностических препаратов.

Предложены эффективные методики инактивации вируса катаральной лихорадки овец, позволяющие получать безопасную, антигенно активную биомассу пригодную для использования в приготовлении вакцины.

Представлена оценка использования адъюванта гидроокиси алюминия в технологии, позволяющие приготовить безвредные и высокоиммуногенные моно и бивалентные вакцины.

Предложена эффективная методика получения аттенуированных штаммов вируса КЛЮ и технология приготовления живой бивалентной вакцины, позволяющая получить безопасный для животных препарат, а также методы контроля качества.

Предложена технология приготовления и методы контроля вакцины против чумы мелких жвачных животных, позволяющая приготовить безопасный иммуногенный препарат, доказавшая на практике свою эффективность (более 66 млн. доз).

Технология приготовления и методы контроля инактивированной бивалентной вакцины против катаральной лихорадки овец, отличающаяся высокой иммуногенностью и стабильностью при хранении.

Личный вклад соискателя. Диссертантом самостоятельно проведены экспериментальные исследования по отработке параметров культивирования вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ в суспензионных и псевдосуспензионных условиях. Самостоятельно проведены исследования по отработке параметров стационарного и роллерного методов культивирования вирусов и получения вирусных суспензий. Самостоятельно проведены лабораторные исследования по отработке параметров приготовления сухой вакцины против ЧМЖЖ, по подбору инактивантов и определению параметров инактивации вируса КЛЮ, составлению моно и бивалентных вакцин. Самостоятельно проведено исследование иммунобиологических свойств разработанной вакцины против ЧМЖЖ, анализ и статистическая обработка экспериментальных материалов, изложенных в таблицах и диаграммах.

Отдельные этапы параметров инактивации и получения аттенуированных штаммов, разработка живой культуральной вакцины против КЛЮ выполнены с участием сотрудников лаборатории технологии культивирования вирусов Ершебулова З, Жугунисова К. и Таранова Д.

Апробация результатов исследований. Материалы по теме диссертации доложены на международных научно-практических конференциях посвященных, 50-летию образования НИИПББ (г.Алматы, 2008г.), I-й международной конференции Астана Биотех (г.Астана, 2008г.), IV международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии", (г.Павлодар, 2008г.), международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (г.Новосибирск, 2009г.), II-й международной конференции Астана Биотех (г.Астана, 2011г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными, зооотическими и зооантропонозными болезнями животных» посвященной 70-летию профессора Н.Асанова, (г.Алматы, 2012г.), международной конференции «Biodefense and Emerging Diseases» Американского общества микробиологов (г.Арлингтон, США, 2016г.) и др.

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 40 научных работ, в том числе 16 статей в журналах входящих в РИНЦ и Перечень рецензируемых научных изданий, утвержденных президиумом ВАК Кыргызской Республики. Материалы работы включены в отчеты о НИР НИИПББ, Национального центра биотехнологии РК, разработано 3 нормативно-технических документа на вакцины и 2 лабораторных регламента. Вакцины включены в Реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

По результатам выполненных работ получено 12 авторских свидетельств на штаммы вирусов, способы получения сывороток, антигенов и на вакцины против чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 344 листах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических предложений, иллюстрировано 80 таблицами и 58 рисунками. Список использованной литературы включает 313 наименований, из них 154 авторов дальнего зарубежья. В приложении содержатся копии документов, подтверждающие результаты работы, их научную новизну и практическую значимость.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования и необходимость разработки вакцин для профилактики чумы мелких жвачных животных и блутанга. Актуализированы вопросы выхода вакцинопрофилактики на новый уровень, необходимость научно-

обоснованных подходов в разработке средств профилактики нового поколения.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дана характеристика биологических свойств вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ, традиционных технологий разработки вакцин для борьбы с инфекциями. Дана характеристика разработанных в мире и на территории СНГ живых и инактивированных вакцин и их эффективность.

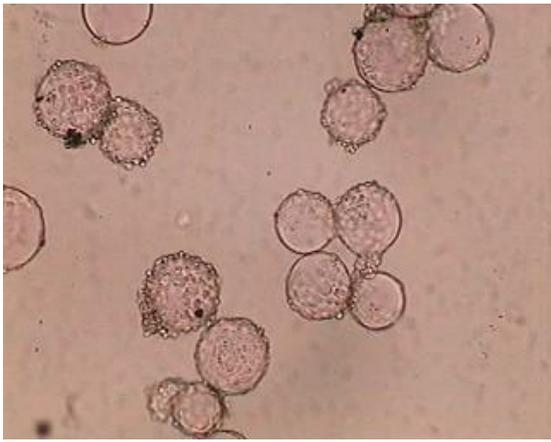
В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследования, методических и биотехнологических подходов выполнения исследований по культивированию культур клеток и вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ суспензионными, на микроносителях, роллерным и стационарными методами.

Объектами исследования являлись вирусы ЧМЖЖ и КЛЮ, первичные и перевиваемые культуры клеток, определение принципиальной возможности наработки вирусной биомассы, подбора стабилизирующих сред для живых вакцин, эффективных инактивантов и оптимальных параметров инактивации вируса КЛЮ, составления бивалентных вакцин. Представлены новые подходы в получении аттенуированных вирусов блутанга и разработки новой живой бивалентной лиофилизированной вакцины.

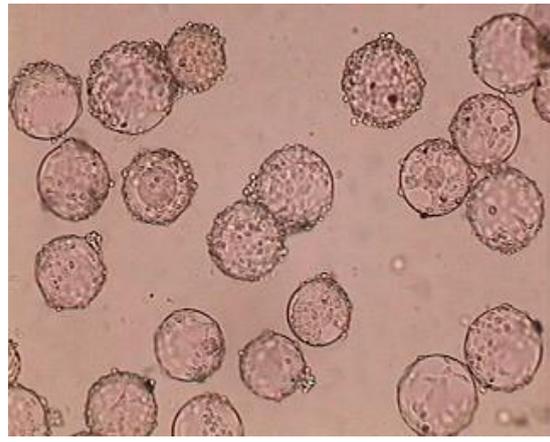
Статистическую обработку результатов исследований выполнили по методике, предложенной Кербером и модифицированной И.П. Ашмариним и А.А. Воробьевым (1962).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований» представлены данные по разработке методов культивирования культур клеток в суспензионных условиях и на различных микроносителях. Представлены результаты экспериментов по изучению возможности культивирования перевиваемых линий ВНК-21, MDBK, MDCK, ПСГК, ПО, ПТ-80, КГ-91, СПЭВ и Vero, на различных микроносителях: Cytodex-1, Cytodex-3, Sephadex A-25 и 2D MicroHex. Результаты опытов показали, что микроносители Cytodex-1 не пригодны для использования при культивировании культур клеток ВНК-21, ПО, ПТ-80, КГ-91 и Vero. В тоже время Cytodex-3 и Sephadex A-25 пригодны для культивирования линии клеток ВНК-21, MDBK, MDCK, СПЭВ и VERO, где отмечено образование плотного монослоя клеток на поверхности микроносителей на 2-3 сут. культивирования. Перевиваемые линии MDBK, MDCK, ПСГК и СПЭВ хорошо росли на Cytodex-1 и Cytodex-3, образуя монослой клеток в течение 1-3 сут. Микроносители 2D MicroHex производства Nalge Nunc International (Дания) из всех испытанных оказались наиболее пригодными для получения клеточной и вирусной биомассы. Результаты проделанных опытов показаны на рисунках 1-4.



MDBK (1-сут) на МН Cytodex-1

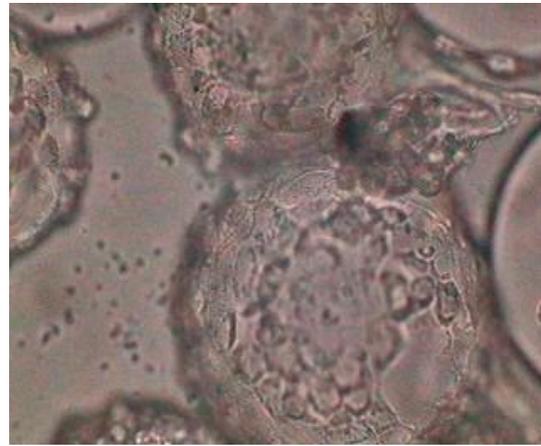


MDBK (3-сут) на МН Cytodex-1

Рисунок 1 - Культивирование клеток MDBK на МН Cytodex-1

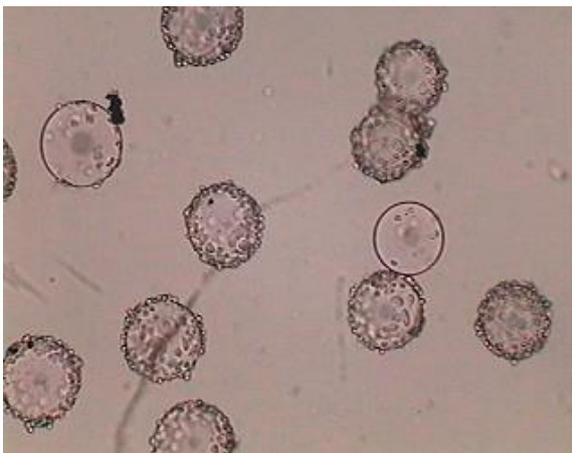


Контроль МН Cytodex-1 (ув.×1000)

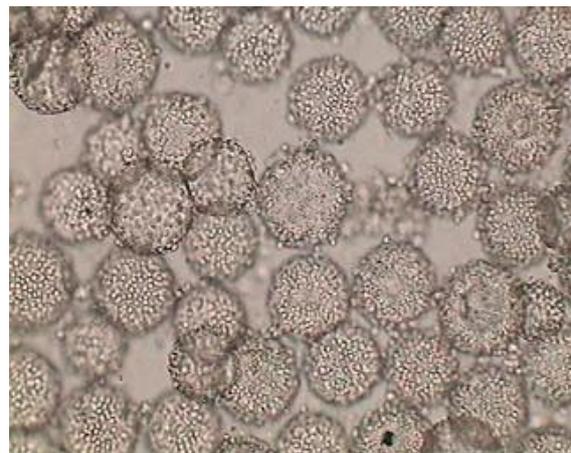


MDCK (3-сут) на МН Cytodex-1

Рисунок 2 - Культивирование клеток MDCK МН Cytodex-1



СПЭВ (1-сут) на МН Cytodex-3



СПЭВ (3-сут) на МН Cytodex-3

Рисунок 3 - Культивирование клеток СПЭВ на МН Cytodex-3



Контроль MH Nunc (ув.×1000)



КГ-91 (3-сут) на MH Nunc

Рисунок 4 - Культивирование клеток КГ-91 на MH Nunc

Проведены эксперименты по изучению возможности репродукции вирусов ЧМЖЖ и катаральной лихорадки овец в культурах клеток MDBK, КГ-91 и Vero культивируемых на микроносителе 2D MicroNex. Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты адаптации вируса ЧМЖЖ к культурам клеток культивируемых на микроносителях 2D MicroNex, n=6

Культура клеток	Пассажный уровень	Длительность инкубирования, сут	Электронно-микроскопический анализ суспензии вируса	Активность антигена в ИФА	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)
MDBK	1	5	Наличие вирионов и рибонуклеопротеида (РНП)	1:64	4,37±0,12
	2	6	Наличие вирионов и РНП	1:64	4,00±0,10
	3	6	Наличие вирионов и РНП	1:128	4,00±0,00
Vero	1	7	Обнаружены вирионы	1:16	3,50±0,12
	2	6	Вирионы вируса	1:32	3,87±0,15
КГ-91	1	8	Вирионы вируса	1:128	3,10±0,16
	2	5	Вирионы вируса	1:64	2,66±0,22
	3	5	Вирионы вируса	1:32	2,00±0,05

Проведенные исследования показали, что наиболее чувствительной к вирусу чумы МЖЖ оказалась культура клеток MDBK, где в течение 5-6 сут вирус накапливался в титре до 4,37±0,12 lg ТЦД₅₀/см³, а антигенная

активность в реакции иммуноферментного анализа составила 1:128. В культуре клеток Vero в течение 2-х пассажей вирус накапливался до $3,87 \pm 0,15$ lg ТЦД₅₀/см³, но антигенная активность вируса оказалась несколько ниже (1:32). Из испытанных культур менее чувствительной оказалась линия клеток КГ-91, где установлено, что по мере пассирования сокращается не только срок культивирования, вместе с тем снижается также антигенная и биологическая активность. Таким образом, наиболее чувствительной к вирусу чумы МЖЖ при культивировании на микроносителях является культура клеток MDBK.

При культивировании вируса КЛЮ в культурах клеток MDBK, КГ-91 и Vero, инкубируемых на микроносителях использовали ту же методику что и при ЧМЖЖ. Исследования показали, что уже на первом пассаже вирус легко адаптируется к культурам клеток, на 2-е сут отмечаются первые признаки деструктивных изменений клеток, а на 3-4 сут культивирования в зависимости от культуры клеток, обнаруживалось практически полное разрушение клеточного пласта. Собранный вирусный материал проверяли в электронной микроскопии и определяли биологическую активность. Результаты экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты адаптации вируса КЛЮ к культурам клеток при культивировании на микроносителях, n=5

Культура клеток	Проявление ЦПД	Длительность инкубирования, час	Электронно-микроскопический анализ	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)
MDBK	+	96	Наличие вирионов	6,75±0,14
КГ-91	+	92	Вирионы и РНП	6,83±0,15
Vero	+	98	Вирионы и РНП	5,75±0,20

В результате проделанных работ установлено, что чувствительными к вирусу КЛЮ оказались все три линии клеток, вирус одинаково накапливался в культурах MDBK и КГ-91, а в линии клеток Vero активность вируса была незначительно ниже при одинаковых сроках инкубирования.

В указанных культурах клеток вирус вызывал деструктивные изменения клеток в виде округления клеток, с дальнейшим отделением пораженных клеток от стекла с выходом в среду и деструкцией монослоя.

Также были проведены работы по культивированию вируса КЛЮ в культурах клеток EL-4 и ВНК-21(2/17) культивируемых в суспензионных условиях. Результаты этих опытов приведены в таблице 3.

Из данных таблицы 3 следует, что вирус в культуре клеток EL-4 в высоких титрах накапливается в течение 2-го и 3-го пассажей, затем снижается его активность. Тогда как, в культуре ВНК-21 на протяжении всех пассажей репродукция вируса остается в высоких титрах.

Таблица 3 - Культивирование вируса КЛЮ в культурах клеток EL-4 и ВНК-21 при культивировании в спиннерах «Techne», n=8

Культура клеток	Пассажный уровень	Концентрация клеток, млн./см ³	Срок культивирования, час	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)
EL-4	1	1,4±0,10	96	4,12±0,07
	2		72	6,58±0,22
	3		72	6,16±0,22
	4		74	4,83±0,08
	5		70	3,91±0,16
ВНК-21 (2/17)	1	1,5±0,12	94	6,75±0,10
	2		92	6,33±0,22
	3		92	6,75±0,14
	4		90	7,75±0,10
	5		93	6,75±0,14
	6		96	7,66±0,08

Таким образом, показано, что линии клеток EL-4 и ВНК-21 (2/17) пригодны для культивирования вируса катаральной лихорадки овец в суспензионных условиях. При этом, если в клетках EL-4 можно культивировать ограниченное количество пассажей, а ВНК-21 вирус можно культивировать на протяжении не менее 6 пассажей.

В главе 4 «Разработка технологии приготовления вакцины против ЧМЖЖ» представлены результаты по подбору наиболее чувствительной культуры клеток, определению оптимальных параметров репродукции вируса и наработке вирусной биомассы. Также показаны результаты подбора стабилизирующей среды, изучения сохраняемости лиофилизированного вируса при различных температурных режимах, а также изучения иммунобиологических свойств вакцины (таблица 4).

Результаты опытов, представленные в таблице 4 показали, что вирус чумы мелких жвачных животных накапливается в более высоких титрах в первичных культурах клеток почек и тестикул ягнят. Другие виды первичных (ПТ, ПО и ПК) клеточных культур и перевиваемая линия VERO обеспечивали накопление вируса в пределах 3,00 – 3,90 lg ТЦД₅₀/см³, наименьшую пригодность для культивирования и наработки вируса показали перевиваемые линии ПС, ПСГК и ПО.

Активность получаемых вирусных материалов во многом зависит от вида клеточного субстрата, в котором проводят наработку вируса.

Таблица 4 – Репродукция штамма G-45МК вируса чумы мелких жвачных животных в различных видах культур клеток

Виды культур клеток	Наименование культур	Количество опытов	Цитопатический эффект	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , (X±m)
Первичная	ПЯ	12	+	4,71±0,18
-«-	ТЯ	8	+	4,16±0,22
-«-	ПТ	5	+	2,33±0,14
-«-	ПО	6	+	3,16±0,12
-«-	ПК	11	+	3,66±0,10
Перевиваемая	VERO	6	+	3,98±0,08
-«-	ПС	4	+	2,28±0,14
-«-	ПСГК	5	+	2,83±0,13
-«-	ПО	3	+	1,92±0,22

В опытах было показано, что в процессе культивирования в культурах клеток различными методами удается получить вирусный материал. Однако, учитывая технологичность используемых методов и себестоимость получаемых при этом препаратов, становится актуальным при масштабировании и изготовлении вакцин подобрать наиболее доступную культуру и технологию получения вирусной биомассы.

Весьма важным при разработке технологии является влияние таких факторов как множественность заражения, состав и кратность смены питательной среды, рН, температура инкубации. Для стандартизации и стабильного получения активных вирусных суспензий необходимо было отработать оптимальные условия наработки вирусной биомассы в культуре клеток ПЯ. В таблице 5 представлены результаты определения множественности инфицирующей дозы вирусом культуры клеток ПЯ.

Результаты исследований, показывают, что репродукция вируса отмечена примерно в одинаковых титрах при инфицировании в дозах от 0,1 до 0,001 ТЦД₅₀/кл. При более низкой дозе заражения (0,0001 ТЦД₅₀/кл) период культивирования вируса дольше по сравнению с другими дозами и накопление вируса было меньше на 1,0 lg ТЦД₅₀/см³. Поэтому учитывая, что при дозе вируса 0,1 ТЦД₅₀/кл расход вирусной расплодки увеличивается, а при наиболее меньшей дозе накопление вируса меньше, а срок культивирования дольше, было принято решение об использовании для наработки вируса дозы в пределах 0,01 до 0,001 ТЦД₅₀/кл.

Резюмируя результаты исследований по сравнению двух способов культивирования вируса чумы мелких жвачных животных, следует отметить, что роллерный метод имеет преимущества перед стационарным, тем, что выход массы вируса получается больше.

Таблица 5 - Накопление вируса ЧМЖЖ в культуре клеток ПЯ в зависимости от множественности заражения

Метод заражения	Доза вируса, ТЦД ₅₀ /кл	Способ культивирования	Длительность культивирования, сут	Кол-во опытов	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)
В питательную среду	0,1	стационарный	8	12	4,67±0,12
	0,01	стационарный	9	10	4,75±0,21
	0,001	стационарный	11	9	4,61±0,18
	0,0001	стационарный	12	11	3,50±0,22
	0,1	роллерный	9	8	4,55±0,12
	0,01	роллерный	10	7	4,83±0,17
	0,001	роллерный	10	9	4,60±0,18
	0,0001	роллерный	12	5	3,70±0,22

Проведенные исследования показывают, что концентрация глутамина и сыворотки крупного рогатого скота не оказывает существенной роли на накопление вируса в культуре клеток ПЯ. Также на уровень репродукции вируса существенного влияния не оказывает рН питательной среды. Однако на репродукцию вируса существенно влияет содержание сыворотки крови животных. Тогда как при использовании сыворотки овец накопление вируса было на 1,0 lg ТЦД₅₀/см³ ниже, чем при использовании сыворотки коров.

При изучении репродукции вируса чумы мелких жвачных животных при различных температурах в культуре клеток ПЯ в стационарных условиях, установлено, что температура оказывает существенное влияние на репродукцию вируса. Наибольшее накопление вируса отмечено при температуре инкубирования 37,0±0,5 °С. Результаты опытов представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Репродукция вируса ЧМЖЖ в культуре клеток ПЯ при различных температурах

Температура инкубации (°С)	Длительность культивирования, сут	Количество опытов	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)
32,0±0,5	7-8	5	3,75±0,17
35,0±0,5	6-7	4	4,00±0,18
37,0±0,5	6-7	5	4,75±0,10
40,0±0,5	5-6	3	3,00±0,19

Таким образом, с использованием установленных параметров были наработаны вирусные суспензии, которые использованы для приготовления экспериментальных образцов вакцины ЧМЖЖ. При этом были приготовлены экспериментальные образцы с 8 разными стабилизирующими средами.

Исследования показали, что наибольшую сохраняемость вакцины обеспечивает стабилизатор, состоящий из пептона (5%) и сахарозы (3%).

Исследования изучению иммунобиологических свойств на животных показали, что препарат обладает низкой реактогенностью, так при высоких дозах ($5 \times 10^{4,0}$ ТЦД₅₀) у отдельных животных вызывает лишь кратковременное повышение температуры тела на 1-2 °С без каких-либо других патологических признаков. Изучение антигенных свойств показало, что при дозе 1000 ТЦД₅₀ на 7 сут вакцина у коз вызывает формирование вируснейтрализующих антител в титрах 1:4, в дальнейшем титр антител нарастал и на 14, 21 сут достигал значений 1:16. При увеличении дозы (3000-5000 ТЦД₅₀), для вакцинации коз в сыворотках крови обнаруживались антитела в титрах 1:8-1:32. Аналогичные результаты получены при вакцинации овец, где при дозе 2000 ТЦД₅₀ на 7 сут в крови животных выявлены антитела в титрах 1:8-1:16. При изучении иммуногенности установлено, что вакцина против ЧМЖЖ в дозе 100 ТЦД₅₀ обеспечивает невосприимчивость животных к контрольному вирусу в дозе 500 ИД₅₀. Учитывая возможные потери вируса при хранении, транспортировке и использовании, рекомендуется использовать 10 кратный запас иммунизирующей дозы вакцины.

Результаты изучения продолжительности иммунитета показали, что у вакцинированных животных, иммунитет сохраняется в течение 15 мес. Полученные нами данные подтверждают результаты полученные ранее по изучению продолжительности иммунитета, где указано что вакцинация животных против чумы обеспечивает их защиту в течение не менее 12 мес.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобрана чувствительная система культивирования вируса ЧМЖЖ, обеспечивающая получение активной вирусной биомассы. Разработаны прописи и подобран состав стабилизирующих сред для высушивания и отработан режим лиофилизации, позволяющий максимально сохранить вирус в вакцинном препарате. Изучены устойчивость вакцины при различных температурных режимах хранения и определена его сохраняемость. Изучены безвредность, реактогенность, и наиболее приемлемая иммунизирующая доза вируса, срок наступления и продолжительность иммунитета у вакцинированных овец и коз.

По результатам проведенных исследований разработана нормативно-техническая документация «Вакцина против чумы мелких жвачных животных», вакцина зарегистрирована в Реестре ветеринарных препаратов и кормовых добавок Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

В главе 5 «Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец» проведены исследования по выбору клеточных культур характеризующихся видовой принадлежностью клеток (ПЯ, ПС) или высокой технологичностью (ВНК-21, VERO и ПСГК). Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Уровень накопления вируса КЛО 4 и 16 серотипов в различных культурах клеток n=5

Культура клеток	Показатель репродукции вируса КЛО (X±m)			
	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³		Антигенная активность	
	4	16	4	16
ПЯ	5,75±0,00	5,25±0,19	н/и	1:3,00±0,80
ВНК-21	6,55±0,00	6,75±0,17	н/и	1:3,33±0,48
ПС	7,33±0,11	6,41±0,13	н/и	1:2,66±0,50
VERO	7,00±0,00	7,25±0,25	н/и	1:4,66±0,91
ПСГК	6,25±0,25	7,00±0,13	н/и	1:4,00±0,75
Примечание - "н/и" - не исследовали				

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что вирус КЛО 4 и 16 серотипов обладает хорошими репродуктивными свойствами во всех испытанных культурах, накапливаясь в довольно высоких титрах, но наиболее высокий показатель вирусной репродукции был получен при его культивировании в клеточных линиях ПС и VERO соответственно.

Проведенные В.А. Сергеевым исследования показали, что ДЭИ в концентрации 0,04-0,06% инактивирует вирус КЛО в течение 3-5 сут. Повышение концентрации инактиванта и продолжительности обработки вируса в 2-3 раза не снижала заметно его иммуногенности и гарантировала получение безопасной вакцины, что свидетельствует о мягком инактивирующем действии ДЭИ на вирус КЛО. Для подтверждения этих данных проведены исследования по инаktivации вирусной суспензии раствором ДЭИ в конечных концентрациях 0,05, 0,1 и 0,2%. Обобщенные данные по кинетике инаktivации 4 и 16 серотипов вируса ДЭИ представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Инаktivация вируса КЛО димерэтиленмином

Длительность инаktivации, ч	Концентрация инаktivанта, %	Активность в ТФ-ИФА		Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m) n=3	
		4-серотип	16-серотип	4-серотип	16-серотип
24	0,05	1:8	1:16	4,87±0,18	5,00±0,17
	0,1	1:4	1:8	4,75±0,22	4,75±0,22
	0,2	1:4	1:8	4,00±0,25	4,50±0,18
48	0,05	1:4	-	4,00±0,20	4,25±0,16
	0,1	-	-	4,00±0,12	4,25±0,22
	0,2	-	-	2,00±0,16	3,00±0,12

продолжение таблицы 8					
76	0,05	-	-	2,00±0,17	1,00±0,20
	0,1	-	-	0,00	0,00
	0,2	-	-	0,00	0,00
контроль	б/и	1:32	1:64	6,75±0,22	6,50±0,20
Примечания: 1 «-» - антигенная активность не обнаружена; 2 «б/и» - без инактиванта.					

Анализ полученных результатов инактивации вируса димерэтиленмином представленный в таблице 8 показывает, что потеря инфекционной активности при использовании 0,1% и 0,2% происходит в течение 76 ч. Тогда как 0,05% ДЭИ в течение 76 ч вирус полностью не инактивирует. Исследования показали, что ДЭИ в испытанных концентрациях не только инактивирует вирус, но и понижает активность антигена выявляемый в ТФ-ИФА, так в течение 24 ч при 0,05 и 0,1% концентрации инактиванта активность антигена понижается в 8 раз.

Согласно данным литературы вирус КЛО инактивируется 0,1% формалином при температуре 37⁰С в течение 24 ч. поэтому проведены исследования для определения кинетики инактивации вируса при использовании 0,05%, 0,1% и 0,2% формалина. Результаты данных исследований представлены на рисунках 5 и 6.

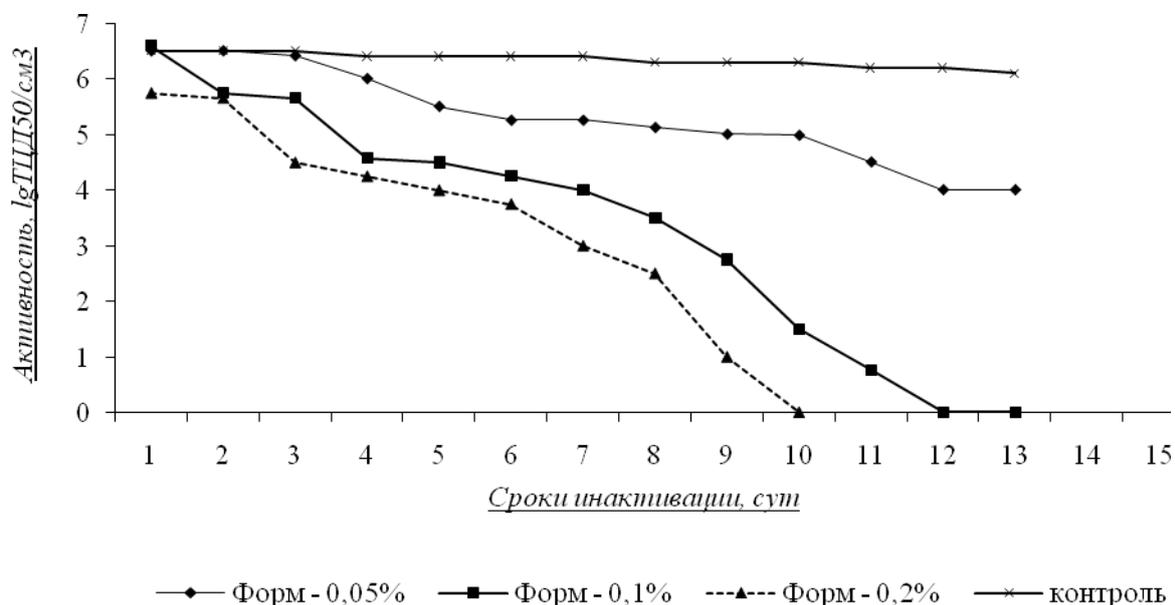


Рисунок 5 - Кинетика инактивации 16 серотипа вируса КЛО формалином

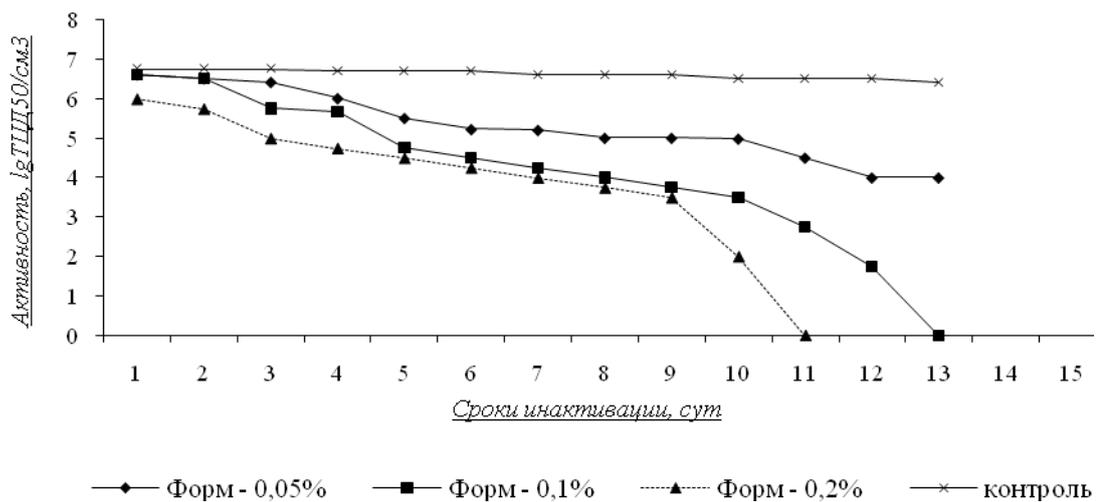


Рисунок 6 - Кинетика инактивации 4 серотипа вируса КЛЮ формалином

Данные по инактивации вируса КЛЮ, показывают, что при воздействии на вирус 0,2 и 0,1% формалина 16 серотип инактивируется на 10 и 12 сут соответственно. Изучение кинетики инактивации 4 серотипа показало, что при тех же концентрациях формалина инактивация вируса отмечается на 11 и 13 сут соответственно, т.е. 4 серотип вируса инактивируется на 24 ч позже, чем 16 серотип. Формалин в концентрации 0,05% в течение 14 сут понижает инфекционную активность вируса лишь на 2,75 lg ТЦД₅₀/см³.

При инактивации 4 и 5 сут с использованием этих же концентраций формалина за указанный период был получен отрицательный результат, хотя инфекционная активность вируса понижалась в среднем до 4,50 lg ТЦД₅₀/см³.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с использованием разных концентраций формалина установлено, что при испытанных условиях инактивации вируса КЛЮ, вначале теряется антигенная, а затем инфекционная активность.

Согласно данным литературы, проверенным и достаточно надежным химическим агентом для инактивации вирусов является β-пропиолактон (БПЛ). Поэтому в опытах изучали воздействие различных концентраций инактиванта в диапазоне: 0,05, 0,1 и 0,2% на вирус КЛЮ. Полученные результаты представлены на рисунках 7 и 8.

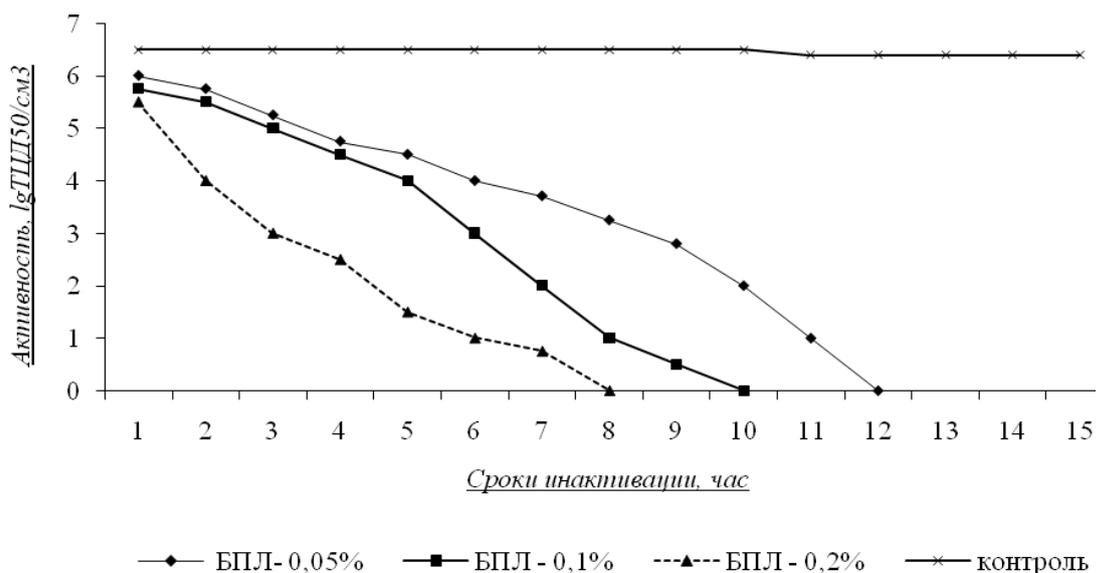


Рисунок 7 - Кинетика инактивации 16 серотипа вируса КЖО бета-пропиолактоном

Проведенные исследования показали, что при концентрациях инактиванта 0,2 и 0,05% используемые серотипы вируса КЖО инактивируются в течение 8 и 12 ч соответственно, а при инактивации вируса с концентрацией препарата 0,1% потеря инфекционной активности 4 серотипа вируса наблюдается в течение 9 ч, а 16 серотипа за 10 ч.

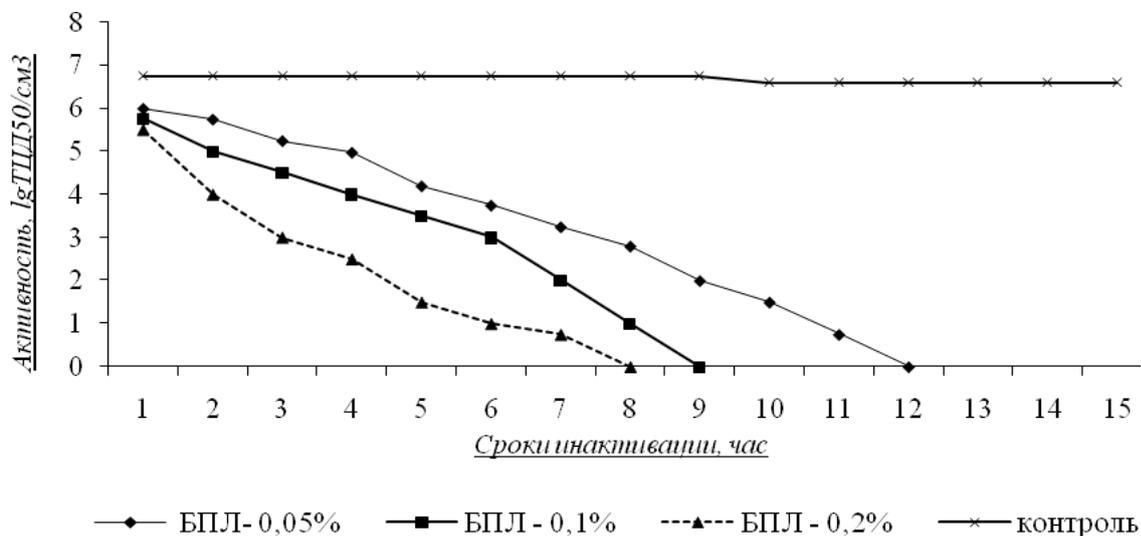


Рисунок 8 - Кинетика инактивации 4 серотипа вируса КЖО бета-пропиолактоном

Сохранность протективных свойств антигенных детерминант определяли в ТФ-ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Влияние бета-пропиолактона на антигенную и инфекционную активность вируса КЛЮ при инаktivации

Длительность инаktivации, ч	Концентрация инаktivанта, %	Антигенная активность в ТФ-ИФА		Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m) n=5	
		4-серотип	16-серотип	4-серотип	16-серотип
8	0,05	1:16	1:32	2,80±0,22	3,25±0,00
	0,1	1:16	1:32	1,00±0,12	0,75±0,12
	0,2	1:8	1:32	0,00	0,00
10	0,05	1:16	1:16	1,50±0,25	2,00±0,25
	0,1	1:8	1:16	0,00	0,00
	0,2	1:4	1:16	0,00	0,00
12	0,05	1:16	1:16	0,00	0,00
	0,1	1:8	1:16	0,00	0,00
	0,2	-	1:4	0,00	0,00
контроль	б/и	1:32	1:64	6,75±0,22	6,50±0,20
Примечания: 1 «-» - антигенная активность не обнаружена; 2 «б/и» - без инаktivанта.					

Полученные данные таблицы 9 свидетельствуют о том, что инфекционная активность вируса КЛЮ под действием формалина, имела криволинейную форму, спад инфекционности более медленный и продолжительный по сравнению с использованием ДЭИ. В результате проведенных исследований установлено, что антигенная активность вирусной суспензии, инаktivированной при концентрации 0,05, 0,1 и 0,2% в течение 3 сут понизилась до 1:8.

Анализ полученных результатов, показывает, что максимальная сохраняемость антигена (1:16) в инаktivированных препаратах наблюдается при использовании БПЛ 0,05% концентрации в течение 12 ч. Инаktivация вируса КЛЮ БПЛ в концентрации 0,1 и 0,2% наряду с потерей инфекционной активности приводит к снижению антигенной активности.

Таким образом, анализируя потерю инфекционной и антигенной активности вируса КЛЮ при изучаемых условиях инаktivации и действие химических инаktivантов – БПЛ, формалина и ДЭИ на протективно значимые антигенные детерминанты, для дальнейших исследований по конструированию вакцинных препаратов, использовали 0,05% раствор БПЛ.

Наиболее важные преимущества любых адъювантных вакцин в том, что их применение более эффективно, чем вакцин без адъювантов, и польза от них превышает риск. Для этого проводили определение адъювантного состава инаktivированных вакцин с использованием различного содержания (5, 10 и 20 мг/см³) гидроокиси алюминия (ГОА).

Важной характеристикой сорбированных вакцин является их реактогенность (безвредность). Установлено, что у кроликов после введения

образцов с содержанием ГОА 5 и 10 мг/см³ на месте введения появлялись инфильтраты, в диаметре около 1,5 см без других клинических признаков заболевания. При вакцинации кроликов с содержанием ГОА 20 мг/см³ инфильтрат был в диаметре 2,5 см. У животных данной группы отмечалось повышение температуры тела и хромота, инфильтрат рассасывался постепенно, исчезая на 25-28 сут. Согласно данным литературы при использовании сорбированных вакцинах допускается образование инфильтрата на месте инъекции вакцины, без проявления других побочных реакций.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований установлено, что для составления инактивированных сорбированных вакцин против КЛЮ допустимым является использование ГОА в концентрации не более 10 мг/см³, превышение концентрации приводит к нежелательным побочным реакциям. Затем изучали иммуногенность приготовленных сорбированных вакцин на овцах. Результаты изучения динамики формирования группоспецифических антител представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты исследований динамики формирования группоспецифических антител у вакцинированных животных

№ п/п	Вид вакцины	Серотип вируса	Вид животного	Титр антител в ТФ-ИФА, сут					
				0	7	14	21	28	40
1	Инактивированная гидроокись-алюминиевая с сапонином (№1)	4	Овца	н/о	н/о	1:200	1:800	1:800	1:400
			Овца	н/о	н/о	1:200	1:800	1:800	1:400
			Коза	н/о	1:100	1:400	1:800	1:1600	1:800
			Коза	н/о	1:100	1:400	1:800	1:1600	1:800
		16	Овца	н/о	1:100	1:200	1:800	1:800	1:800
			Овца	н/о	н/о	1:200	1:800	1:800	1:400
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:800	1:1600	1:800
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:800	1:1600	1:800
2	Инактивированная гидроокись-алюминиевая (№2)	4	Овца	н/о	н/о	1:100	1:800	1:800	1:400
			Овца	н/о	н/о	1:100	1:800	1:800	1:400
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:800	1:1600	1:800
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:400	1:1600	1:800
		16	Овца	н/о	1:100	1:200	1:200	1:800	1:200
			Овца	н/о	н/о	1:200	1:200	1:800	1:200
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:200	1:1600	1:200
			Коза	н/о	1:100	1:200	1:200	1:1600	1:200

Примечание - «н/о» - не обнаружено

Как видно из данных таблицы 10, при иммунизации животных сорбированными (инактивированная гидроокись-алюминиевая с сапонином и инактивированная гидроокись-алюминиевая) вакцинами на 14 и 21 сут после иммунизации отмечено накопление группоспецифических антител в титрах от 1:100 до 1:800.

Далее на основании полученных данных была приготовлена опытно-экспериментальная серия сорбированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов вируса КЛЮ. Были проведены эксперименты по определению оптимальной иммунизирующей дозы бивалентной вакцины против КЛЮ. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Динамика формирования специфических к вирусу КЛЮ антител у вакцинированных животных

Вид вакцины	Доза вакцины, см ³	Кол-во животных в опыте	Титр антител в ТФ-ИФА, сут				
			0	7	14	21	28
Сорбированная инактивированная бивалентная вакцина против КЛЮ	5	8	н/о	1:400	1:400-1:800	1:3200-1:6400	1:3200
	2	9	н/о	1:400	1:800-1:1600	1:1600-1:3200	1:3200-1:6400
	1	8	н/о	1:200	1:200-1:400	1:800	1:800-1600
Примечание - «н/о» - не обнаружено.							

Из данных таблицы видно, что на 7 сут после вакцинации у животных обнаружены антитела в титре от 1:200 до 1:400. На 14 сут динамика титра специфических антител составила до 1:1600, на 21 и 28 сут титр антител составил в пределах 1:800-6400.

Исследования по выявлению ВНА показали, что на 7 сут после вакцинации у животных, привитых в дозе 2 и 5 см³ обнаруживаются ВНА против 4 и 16 серотипов в титре 1:4 для обоих серотипов. Исследования сывороток крови, на 14 и 21 сут показали наличие ВНА в титрах 1:8 и 1:32 соответственно у животных привитых в дозе 2 и 5 см³.

При иммунизирующей дозе 1 см³ на 7 сут после введения сорбированной вакцины ВНА у животных не выявлялись. На 14 сут при ревакцинации (1 см³) у животных ВНА через 7 сут выявлялись уровне 1:2, а через 21 сут в титре 1:4.

Таким образом, доза инактивированных бивалентных вакцин против вируса КЛЮ 4 и 16 серотипов, равная 2 см³, является оптимальной, которая способна вызывать у вакцинированных овец напряженный иммунитет с образованием вируснейтрализующих антител, в сыворотках крови вакцинированных животных. Уровень вируснейтрализующих антител у контрольных животных через 21 сут (после заражения) составлял в пределах 1:32-1:64 для обеих серотипов вируса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что культуральная бивалентная инактивированная сорбированная вакцина против КЛЮ,

изготовленная из 4 и 16 серотипов, являются иммуногенным и формирует у овец напряженный иммунитет после вакцинации.

Исследования по определению влияния кратности введения вакцины и интервалов между вакцинациями на напряженность иммунитета представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты определения иммуногенности инактивированной сорбированной бивалентной вакцины в зависимости от кратности их введения

Вакцина	Интервал между введениями, сут	Результаты РН, log ₂		Контрольное заражение
		4 серотип	16 серотип	
Сорбированная	однократное	1,5	1,8	8/5
	7	2,0	3,0	8/4
	14	3,0	4,0	8/0
	21	4,0	5,0	8/0
	28	5,0	5,0	8/0
Контрольные животные				10/8
Примечание - количество животных в опыте / количество заболевших животных.				

Полученные данные, показывают, что однократное введение сорбированной вакцины не защищает овец от контрольного заражения и не обеспечивает создание напряженного иммунитета.

У овец, привитых сорбированной бивалентной вакциной двукратно, с интервалом 7 сут, не формируется устойчивый иммунитет к контрольному заражению, как и у овец, привитых однократно. Однако, двукратное введение с интервалом 14, 21 и 28 сут, защищало животных при контрольном заражении вирусом КЛЮ.

Изучена иммуногенность вакцины в зависимости от способа введения. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Обобщенные результаты исследований по определению способа вакцинации

Вакцина	Способ введения	Титры ВНА на 28 сут, log ₂		Клинические признаки				
				Количество овец		Лихорадка, °С	Другие признаки заболевания	Общее состояние животных
		4 серотип	6 серотип	Всего	Реагирующих			
Сорбированная	Внутри-мышечно	2,0±0,16	2,5±0,12	8	0	39,5-39,8	отсутствует	удовлетворительно
	Подкожно	1,2±0,19	1,5±0,21	8	2	41,3	припухлость в месте инъекции	неудовлетворительно

При изучении иммуногенности вакцины в зависимости от способа введения установлено, что при внутримышечном введении инактивированной сорбированной бивалентной вакцины в дозе 2 см³ в сыворотках крови на 28 сут у животных были обнаружены ВНА в титрах от 2,0 до 2,8 log₂, что на 0,7-1,0 log₂ выше при сравнении с подкожным способом введения вакцины.

В результате проведенных исследований было установлено, что внутримышечный способ введения инактивированной сорбированной бивалентной вакцины против КЛЮ является более эффективным по сравнению с подкожным способом введения.

Продолжительность иммунитета у вакцинированных овец судили по уровню ВНА в РН и по результатам контрольного заражения патогенным вирусом КЛЮ 4 и 16 серотипов через 3 и 6 мес. Результаты показаны в таблице 14.

Таблица 14 – Продолжительность иммунитета у овец привитых инактивированной бивалентной вакциной против КЛЮ

Группы животных	Иммуногенность вакцины		Продолжительность иммунитета, мес		
			1	3	6
Сорбированная бивалентная вакцина	4 серотип	ВНА	2,00 log ₂	2,80 log ₂	3,50 log ₂
		КЗ	-	0/12	0/12
	16 серотип	ВНА	2,50 log ₂	3,00 log ₂	3,50 log ₂
		КЗ	-	0/14	0/14
Контрольные	4 серотип	-	-	5/3	4/2
	16 серотип	-	-	6/3	5/2

Примечания:
1 «ВНА» - вируснейтрализующие антитела;
2 «КЗ» - контрольное заражение;
3 «числитель»- количество заболевших животных;
4 «знаменатель»- количество животных в опыте.

Из данных представленных в таблице 14 видно, что у животных уровень ВНА остается стабильным на протяжении 6 мес, (срок наблюдения). У привитых животных сорбированной вакциной ВНА накапливаются в титрах 2,00-3,50 log₂.

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов установлено, что опытные образцы инактивированной бивалентной сорбированной вакцины создают иммунитет у вакцинированных овец с продолжительностью не менее 6 мес (срок наблюдения).

В главе 6 «Разработка технологии получения аттенуированной вакцины против катаральной лихорадки овец» проведены исследования по аттенуации штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ в

культурах клеток ПС и Vero в течение 38 последовательных пассажей. Результаты данных исследований представлены на рисунке 9.

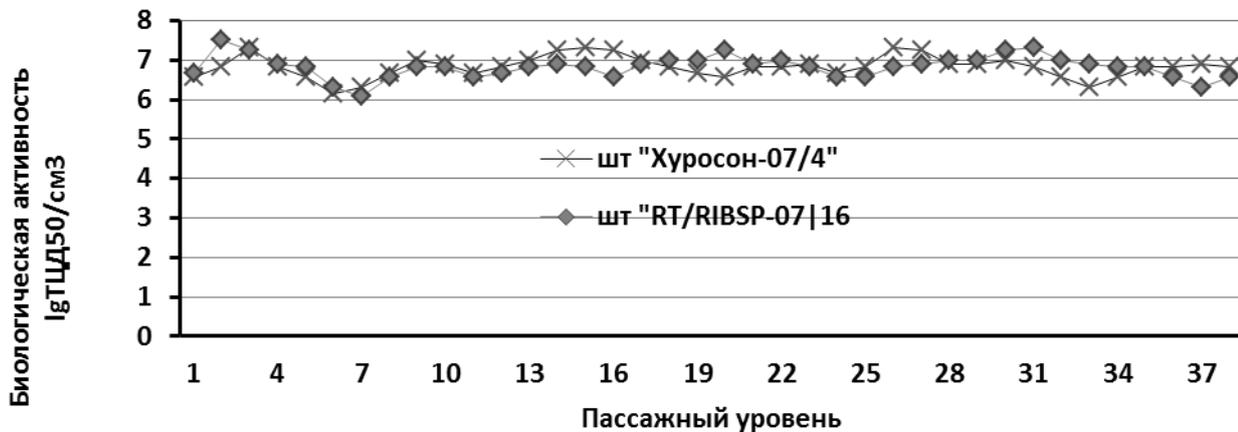


Рисунок 9 - Уровень накопления штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ, при пассировании в культуре клеток ПС и Vero

На протяжении проведенных 38 пассажей, каких-либо изменений при культивировании вируса не обнаружено. По мере пассирования через каждые 5 пассажей проверяли степень аттенуации вируса на 1-3 сут мышатах сосунах.

Установлено, что по мере пассирования вируса отмечено постепенное снижение патогенности вируса в отношении мышат сосунов (рисунок 10).

Вирус 40 пассажа вызывал гибель около 10% инфицированных мышат. Наличие вируса в опытных образцах суспензии подтверждено электронно-микроскопическим анализом (рисунок 11).

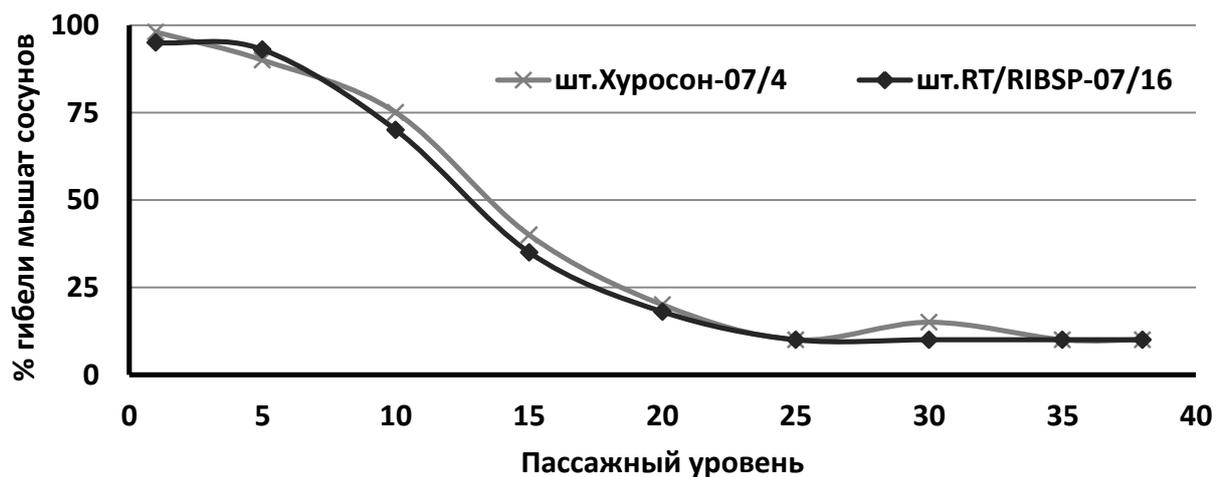


Рисунок 10 - Степень аттенуации штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ на мышатах сосунах

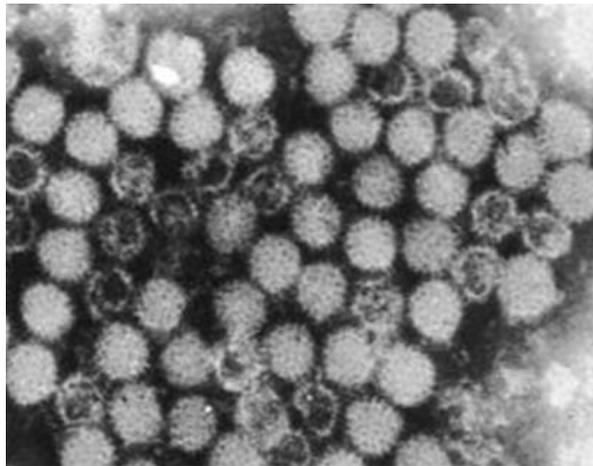


Рисунок 11 - Электронная микрофотография очищенного вируса КЛО
(Ув. $\times 100\ 000$)

Таким образом, проведенные исследования по аттенуации вируса КЛО в культуре клеток показывают, снижение патогенных свойств вируса в отношении мышат сосунов, свидетельством чего является снижение процента гибели мышат до 90 % с каждым пассажным уровнем. Но полной аттенуации вируса не происходит, так как 10 % мышат погибают при интрацеребральном заражении.

Для получения аттенуированного кандидатного штамма в экспериментах использовали метод аттенуации вируса КЛО в 8-10 сут куриных эмбрионах (КЭ) методом последовательного пассирования. Для этого провели 40 пассажей. На протяжении проведенных 40 последовательных пассажей в КЭ, каких-либо изменений в сроках культивирования вируса не обнаружено. При этом инфекционный титр штамма «RT/RIBSP-07/16» при титровании в культуре клеток ПС составил от $6,58 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/мл до $6,91 \pm 0,16$ lg ТЦД₅₀/мл, а титр штамма «Хуросон-07/04» в клетках Vero составил $6,67 \pm 0,12$ - $6,83 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/мл. Результаты опытов по культивированию вируса КЛО в КЭ и гибель эмбрионов по мере пассирования представлены на рисунках 12 и 13.

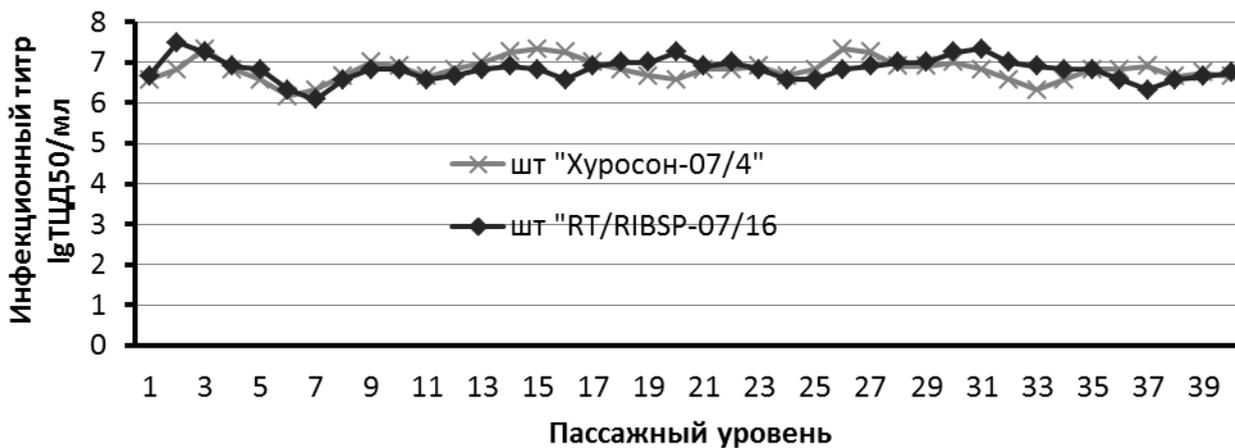


Рисунок 12 - Уровень накопления вируса КЖО при пассировании в КЭ штаммов «Хуросон-07/04» и «RT/RIBSP-07/16»

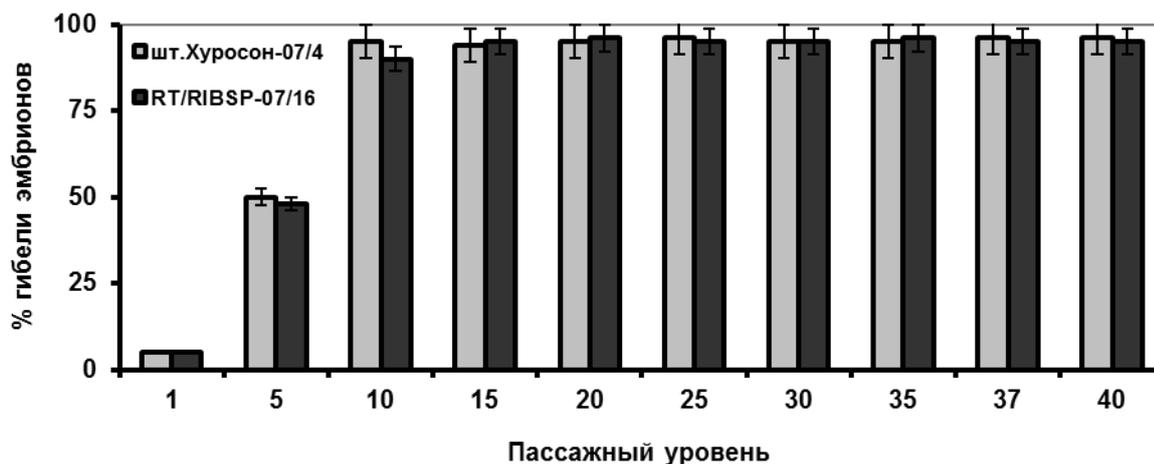
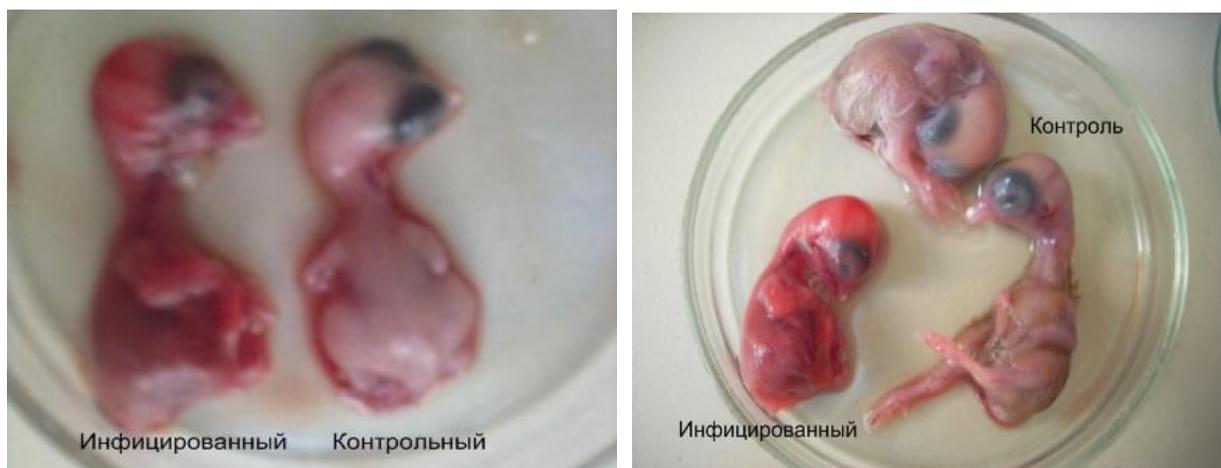


Рисунок 13 - Графическое изображение процента гибели КЭ по мере пассирования штаммов «Хуросон-07/04» и «RT/RIBSP-07/16»

Как видно из данных рисунок 13 гибель эмбрионов в первых 5 пассажах составляла 5 %. При дальнейшем культивировании с 5 по 10 пассаж наблюдается адаптация вируса к КЭ, при этом гибель эмбрионов составляла до 50 %. К 15 пассажному уровню гибель эмбрионов с проявлением признаков поражения инфекцией (рис. 14) составила 90-95 %. Вышеуказанный процент гибели эмбрионов сохранялся и на 40 пассажном уровне.

Гибель КЭ происходила на 2-5 сут после инфицирования, при вскрытии эмбрионы имели красный цвет, характеризующий геморрагическое воспаление кожи, подкожной клетчатки и мышц. Степень аттенуации вируса, оценивали с интервалом 5 последовательных пассажей в КЭ. С этой целью проводили интрацеребральное заражение 1-3 сут мышат.



А

Б

Рисунок 14 - Проявление инфекционного процесса КЛЮ в КЭ

При этом в качестве инфицирующего материала использовали 20 % гомогенат КЭ. Результаты данных исследований представлены на рис. 15.

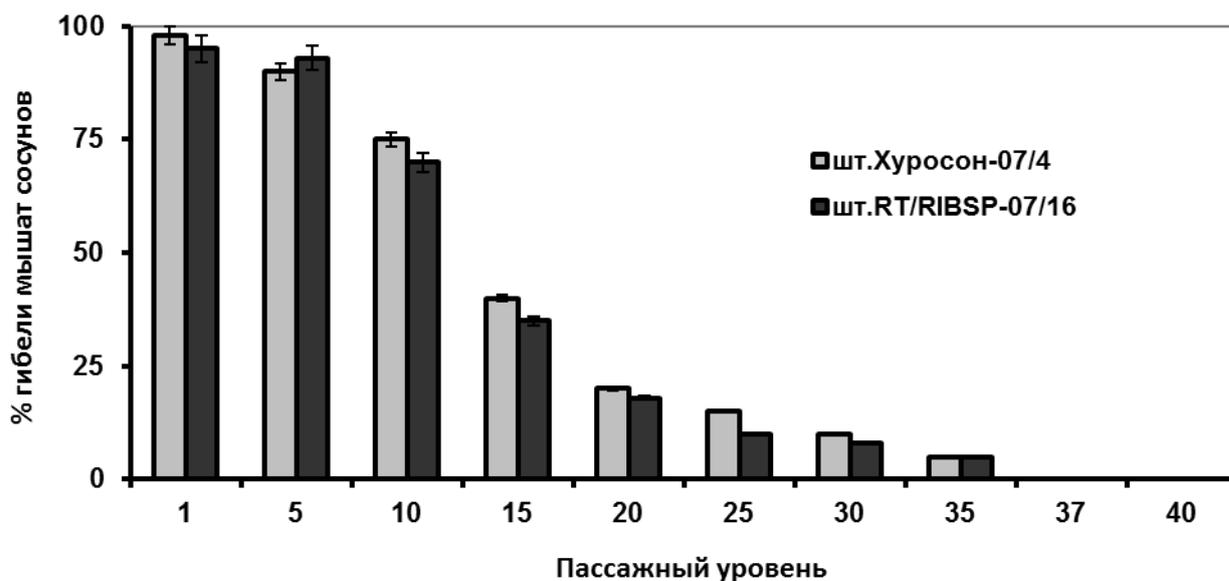
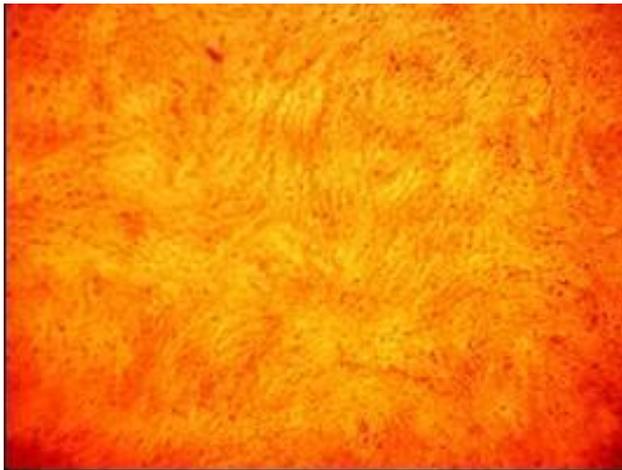


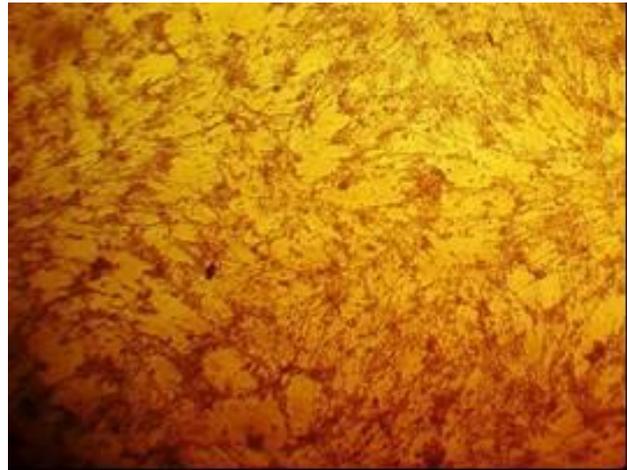
Рисунок 15 - Контроль аттенуации вируса КЛЮ на мышатах сосунах

Как видно из рисунка 15, при изучении степени аттенуации штаммов «Хуросон-07/04» и «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ, установлено снижение патогенных свойств вируса в отношении мышат сосунов с 5 по 36 пассажный уровень, свидетельством чего является снижение процента гибели мышат с каждым пассажным уровнем и с 37 по 40 пассаж получен аттенуированный вирус, который не обладал патогенными свойствами при интрацеребральном введении мышат-сосунов.

Мышата (6 сут) и овцы (14 сут) в период наблюдения не заболели без проявления каких-либо признаков заболевания и остались живыми. Всего было проведено 10 пассажей, на протяжении которых аттенуированный вирус, не проявлял патогенных свойств при интрацеребральном введении мышат-сосунов, все мышата оставались живыми в течении срока наблюдения (6 сут). Одновременно для контроля наличия вируса КЛЮ в исследуемых пробах, из головного мозга убитых мышат готовили 20 % суспензию, которой инфицировали культуру клеток ПС (рис. 16).



Контроль



Проявление ЦПД вируса

Рисунок 16 - Репродукция вируса КЛЮ в культуре клеток ПС
(Ув. 3,5×10)

В результате проведенных исследований установлено, что начиная с 48 час после инфицирования, наблюдаются первые, видимые в световой микроскоп цитопатические изменения клеток, и на 72-96 час обнаруживалось практически полное разрушение монослоя клеток с проявлением характерного для вируса КЛЮ цитопатической картины, характеризующаяся в виде пикноза ядер, округления клеток, лизиса межклеточного вещества и образования синтиций.

Затем были проведены исследования по определению оптимальных параметров культивирования аттенуированного штамма в культурах клеток. Нарботку аттенуированного штамма «Хуросон-07/4», вируса КЛЮ проводили стационарным методом, в культуре клеток почки сайги (ПС). Штамм «RT/RIBSP-07/16» вируса КЛЮ наработан в монослойной культуре клеток Vero.

Активность и специфичность культурального антигена штамма «Хуросон-07/4» вируса КЛЮ, определяли в ИФА (Тест-система диагностическая ID Screen Bluetongue Competition, Франция). Полученные в ходе проведенных исследований результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Биологическая и специфическая активность, стерильность вирусной биомассы штамма «Хуросон-07/4» вируса КЛО

№ серии	Инфекционный титр, lg ТЦД ₅₀ /мл (X±m), n=3	Титр в ИФА	Специфичность в ИФА			
			КЛО	ОО	ЧМЖЖ	КЭОиК
1	6,25 ± 0,08	1:16	+	-	-	-
2	6,66 ± 0,08	1:16	+	-	-	-
3	7,25 ± 0,12	1:32	+	-	-	-
Примечания 1 «+» - положительная реакция 2 «-» - отрицательная реакция						

Как видно из данных таблицы 15, в результате проведенных исследований было установлено, что аттенуированный вирус накапливается в культурах клеток в титрах от 6,25±0,08 lg ТЦД₅₀/мл до 7,25±0,12 lg ТЦД₅₀/мл. Антигенная активность исследуемых проб в ИФА составила 1:16 - 1:32. Проверка контаминации высевками на селективные среды оставались чистыми, роста посторонней микрофлоры не отмечено.

Изучив литературные источники для лиофилизации штаммов «RT/RIBSP-07/16» и «Хуросон-07/4» вируса КЛО было выбрано и приготовлено шесть стабилизирующих сред: пептон/лактоза - 3/2 %, пептон/лактоза - 5/3 %, пептон/сахароза - 3/2 %, пептон/сахароза - 5/3 %, сахароза/желатин - 10/1 % и обезжиренное молоко 50 %. Приготовленные защитные среды смешивали в соотношении 1:1 с вирусной суспензией, разливали в ампулы по 1,0 мл, и лиофилизировали на сублимационных установках.

После окончания лиофилизации, определяли биологическую активность и наличие посторонних контаминантов в полученных образцах (таблица 16).

Таблица 16 - Определение биологической активности лиофилизированных материалов

Содержание компонентов в вакцинной жидкости	Титр вируса до высушивания, lg ТЦД ₅₀ /мл (X±m)	Титр вируса после высушивания, lg ТЦД ₅₀ /мл (X±m)
Пептон 5 % / Лактоза 3 %	7,12 ± 0,13	6,91 ± 0,04
Пептон 3 % / Сахароза 2 %		6,25 ± 0,19
Пептон 5 % / Сахароза 3 %		6,33 ± 0,00
Пептон 10 % / Желатин 1 %		6,08 ± 0,08
Обезжиренное молоко 50 %		5,91 ± 0,13
Без стабилизатора		3,50 ± 0,09

Результаты проведенных исследований показали, что стабилизатор состоящий из пептона и лактозы является оптимальным, где отмечено минимальное снижение биологической активности вируса после лиофилизации.

При отработке режима лиофильного высушивания лабораторных серий живой вакцины против КЛЮ была определена схема лиофилизации состоящая из следующих этапов:

- Глубокая заморозка в течение 12 ч при температуре минус 56 °С;
- Лيوфилизация при режиме 15 %/15 °С, под вакуумом 0,8-1,0 бар;
- Досушивание препарата при температуре + 24°С в течение 8-10 ч.

Продолжительность лиофилизации при этом режиме составила 48 ч.

Для приготовления бивалентной вакцины был наработан вирусный материал в культуре клеток ПС. Результаты исследований представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Нарботка вирусной биомассы штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» в культурах клеток ПС

Штамм	Серия/Время инкубирования, ч	Инфекционный титр, lg ТЦД ₅₀ /мл (X±m), n=3	Активность и специфичность в ИФА	Объем, мл
«Хуросон-07/4»	1/96	7,25 ± 0,14	1:32	1500
	2/96	7,08 ± 0,08	1:16	1500
	3/96	7,16 ± 0,08	1:16	1400
«RT/RIBSP-07/16»	1/96	6,66 ± 0,16	1:8	1400
	2/96	6,41 ± 0,08	1:16	1300
	3/96	6,25 ± 0,14	1:16	1500

Таким образом, в результате проведенных исследований, было наработано по 3 серии вирусной биомассы штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» в культуре клеток ПС.

С использованием наработанных культуральных вирусных биомасс и отработанных параметров живой вакцины против КЛЮ, были приготовлены 3 опытно-экспериментальные серии живой бивалентной культуральной вакцины против КЛЮ.

Безвредность и реактогенность бивалентной вакцины проверяли методом подкожного введения овцам и кроликам в исходном разведении в дозе 1000000 ТЦД₅₀ в объеме 1,0 мл. Белым мышам вакцину вводили подкожно в дозе 100000 ТЦД₅₀ в объеме 0,1 мл. Наблюдения за привитыми животными проводили в течение 10-14 сут. Результаты свидетельствуют о том, что в течение всего периода клинического наблюдения (14 сут) за подопытными

животными контрольной и опытной группы не отмечено случаев гибели, истощения, и других клинических признаков болезни специфичных для вируса КЛЮ.

В дальнейших исследованиях определяли оптимальную иммунизирующую дозу живой бивалентной культуральной вакцины против КЛЮ на 16 овцах местной породы. С этой целью животных вакцинировали в дозах 10, 100, 1000 и 10000 ТЦД₅₀ в объеме 1,0 мл подкожно.

Установлено, что животные, вакцинированные в дозах от 1000 до 10000 ТЦД₅₀, были устойчивы к контрольному заражению. Животные контрольной группы реагировали на контрольное заражение и заболели с характерными клиническими признаками КЛЮ.

Исходя из того, что иммунизирующая доза составила 1000 ТЦД₅₀, в качестве прививной дозы вируса КЛЮ, рекомендуется использовать 10000 ТЦД₅₀, с учетом 10-кратного запаса на различные возможные потери и инактивацию вируса в ходе транспортировки и хранения вакцины.

Резюмируя полученные результаты, следует отметить, что в ходе проведенных исследований разработана технология приготовления бивалентной сухой вакцины. Изучение иммунобиологических свойств на животных показало, безвредность, отсутствие реактогенности и способность формировать вируснейтрализующие антитела к вирусу КЛЮ. По результатам выполненных работ разработана нормативно-техническая документация «Вакцина бивалентная против катаральной лихорадки овец».

ВЫВОДЫ

1. Анализ данных МЭБ, ФАО и собственных исследований показывает, что ЧМЖЖ и КЛЮ имеют широкое распространение среди овец и коз, а также встречается в сопредельных с Республикой Казахстан странах. Первые вспышки ЧМЖЖ на территории Республики Казахстан, отмечены в 2003 г. в Кыргызской Республике с 2005 г. Циркуляцию вируса КЛЮ на территории Казахстана и Кыргызстана доказывает наличие антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных.

2. Из очага инфекции в Республике Таджикистан выделены штаммы "RT/RIBSP-07/16" (16 серотип) и "Хуросон-07/4" (4 серотип) вируса катаральной лихорадки овец и изучены их иммунобиологические свойства. Штаммы депонированы в Республиканском депозитарии микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК.

3. Отработаны технологические параметры наработки и получения суспензии вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ в культурах клеток суспензионным, на микроносителях, роллерным и стационарными методами, пригодные для использования в приготовлении вакцин.

4. Разработана технология изготовления вакцины против ЧМЖЖ. По разработанной технологии приготовлены серии вакцин. Изучены

иммунобиологические свойства вакцины против ЧМЖЖ по параметрам безвредность, иммуногенность, срок наступления и продолжительность иммунитета. Вакцина зарегистрирована на территории Казахстана и внедрена в практику ветеринарии.

5. Организовано производство и осуществляется промышленный выпуск вакцины против ЧМЖЖ. Для нужд ветеринарии изготовлено и использовано на практике более 66 млн. доз вакцины.

6. Разработана технология приготовления инаktivированных моновалентных вакцин против 16 и 4 серотипов вируса КЛЮ.

7. Разработаны технологии приготовления бивалентных инаktivированных вакцин против 16 и 4 серотипов КЛЮ, изучены иммунобиологические свойства. Нормативно-техническая документация по изготовлению и контролю, а также вакцина прошла регистрационные испытания в Министерстве сельского хозяйства Республики Казахстан.

8. Оработаны и адаптированы технология получения ослабленных штаммов вируса КЛЮ. По разработанной технологии получены вакцинные штаммы «Хуросон-40/13/4» и «RT/RIBSP-40/13/16» и изучены их иммунобиологические свойства по параметрам безопасность, реактогенность, реверсibilidade и иммуногенность.

9. Оработаны технологические параметры наработки и получения суспензии вирусов КЛЮ в культурах клеток. Разработан и определен оптимальный состав вакцины и оработана технология составления бивалентной вакцины.

10. Разработана технология приготовления живой сухой бивалентной вакцины против КЛЮ и изучены его иммунобиологические свойства. Нормативно-техническая документация на вакцину и технологию изготовления утверждена в НИИ проблем биологической безопасности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования разработано:

1. Лабораторный регламент по культивированию вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ суспензионным методом;

2. Лабораторный регламент по культивированию вирусов ЧМЖЖ и КЛЮ на микроносителях.

3. Стандарт организации СТ 405-1919-04 ГП-078-2013, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению вакцины против чумы мелких жвачных животных.

4. Стандарт организации СТ 405-1919-04 ГП-069-2011, Временная инструкция по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению вакцина сорбированная бивалентная инаktivированная против катаральной лихорадки овец.

5. Стандарт организации СТ 405-1919-04 ГП-082-2014, Временную инструкцию по изготовлению и контролю и Временное наставление по применению вакцина бивалентная против катаральной лихорадки овец.

6. Получено Регистрационное свидетельство «Вакцина против чумы мелких жвачных животных №РК-ВП-1-24-87-13», выданный Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан, от 19.09.2013 г.

7. Получен Сертификат № KZ 1 646 00017 от 14.01.2011 г., «Вакцина против чумы мелких жвачных животных», выданный Национальным центром экспертизы и сертификации Департамента метрологии и технического регулирования по г.Алматы. Вакцина внесена в Реестр отечественных товаропроизводителей, для участия в тендерах и государственных закупках.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Пат. 16916, Казахстан, 2004/1481.1 Способ приготовления вакцины против чумы мелких жвачных животных [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, Б.М. Хайруллин, Е.Н. Троицкий, К. Кулманбетов Опубликовано 26.10.2004.

2. Абдураимов, Е.О. Идентификация вируса чумы мелких жвачных животных методом ОТ-ПЦР [Текст] / К.Т. Султанкулова, Н.Т. Сандыбаев, Е.В. Жолдыбаева, В.М. Строчков, В.Л. Зайцев, С.М. Мамадалиев, С. Нурабаев // Биотехнология. Теория и практика, Астана, №4 2007. – С. 86-90.

3. Абдураимов, Е.О. Разработка метода культивирования вируса катаральной лихорадки овец в суспензионной культуре клеток ВНК-21 [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Ж.Ж. Саметова, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов // Мат. 1-ой межд. конф. "Астана Биотех 2008", Астана. 2008. – С. 37.

4. Абдураимов, Е.О. Перспективы использования микроносителей при наработке вирусной биомассы для изготовления биопрепаратов [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.Ж. Саметова, Н. Кипшакбаева, К.Д. Жугунисов // Мат. 1-ой межд. конф. "Астана Биотех 2008", Астана. 2008. – С. 38.

5. Абдураимов, Е.О. Культивирование вируса катаральной лихорадки овец с использованием сывороток крови различных видов животных [Текст] / Е.О. Абдураимов, Д.С. Таранов, К.Д. Кулманбетов, З.Д. Ершебулов, К.Д. Жугунисов // Мат. IV межд. науч.-практ. конф. "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии", Павлодар. 2008. – С.58.

6. Абдураимов, Е.О. Изучение культуральных свойств вируса катаральной лихорадки овец, выделенного в Республике Таджикистан [Текст] / Е.О. Абдураимов, Ж.К. Кошематов, З.Д. Ершебулов, С.Ш. Нурабаев // Мат. межд. науч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической

безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 34-36.

7. Абдураимов, Е.О. Определение оптимальных параметров суспензионного культивирования линии клеток EL-4 [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.Ж. Сембаева, Н.Т. Битов // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 39-41.

8. Абдураимов, Е.О. Адаптация и культивирование вирусов чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец в культурах клеток на микроносителях [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.К. Кошеметов, В.Л. Зайцев // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 93-97.

9. Абдураимов, Е.О. Изучение влияния стабилизирующих добавок на сохранность вируса чумы мелких жвачных животных [Текст] / Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, К.Д. Кулманбетов, З.Д. Ершебулов, Ж.К. Кошеметов // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 212-214.

10. Абдураимов, Е.О. Культивирование вируса чумы мелких жвачных животных в культурах клеток [Текст] / Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, К.Д. Кулманбетов, З.Д. Ершебулов, Ж.К. Кошеметов // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С.215-217.

11. Абдураимов, Е.О. Сравнительная оценка выделенных различными методами вирусспецифических иммуноглобулинов против вируса чумы мелких жвачных животных в лабораторных тест-системах [Текст] / Ж.К. Кошеметов, С.Ш. Нурабаев, В.М. Матвеева, А.Ж. Ажибаев, Б.К. Бурабаев, М.И. Корягина, А.А. Бурабаев, Е.О. Абдураимов // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 350-353.

12. Абдураимов, Е.О. Создание современного экспериментального производства аттенуированных вакцин в НИИПББ НЦБ МОН РК [Текст] / Е.О. Абдураимов, Е.Н. Троицкий, С.М. Мамадалиев, Б.М. Хайруллин, К.Б. Баракбаев, С.Б. Тажикен // Мат. междунауч.-практ. конф., посв. 50-летию НИИ проблем биологической безопасности НЦБ РК "Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития", Алматы. 2008. – С. 413-417.

13. Пат. 22179 Казахстан, 2008/1211.1 Способ культивирования вируса чумы мелких жвачных животных на микроносителях [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, К.Д. Кулманбетов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов; Опубликовано 06.11.2008г.

14. Пат. 22184 Казахстан, 2008/1016.1 Штамм "Хуросон-07/4" 4 серотип вируса катаральной лихорадки овец, для приготовления диагностических и профилактических препаратов [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, Ж.К. Кошематов, В.М. Матвеева, С.Ш. Нурабаев, З.Д. Ершебулов, М.Мамбеталиев, М.Корягина, Б.Хайруллин, М.Амирбеков, М.Аноятбеков, Г.Бобоев, Ш.Джумаев; Опубликовано 10.09.2008г.

15. Пат. 22289 Казахстан, 2008/1015.1 Штамм "RT/RIBSP-07/16" 16 серотип вируса катаральной лихорадки овец, для приготовления диагностических и профилактических препаратов [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, Ж.К. Кошематов, В.М. Матвеева, С.Ш. Нурабаев, З.Д. Ершебулов, М.Мамбеталиев, М.Корягина, Б.Хайруллин, М.Амирбеков, М.Аноятбеков, Г.Бобоев, Ш.Джумаев; Опубликовано 10.09.2008г.

16. Пат. 22259 Казахстан, 2008/1213.1 Способ приготовления вакцины против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, К.Д. Кулманбетов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Б.Хайруллин; Опубликовано 06.11.2008г.

17. Пат. 22285 Казахстан, 2008/1212.1 Способ суспензионного культивирования вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, К.Д. Кулманбетов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Ж.Ж. Саметова, Н.Б. Кипшакбаева; Опубликовано 06.11.2008г.

18. Абдураимов, Е.О. Определение параметров культивирования вируса блютанга для использования в технологии изготовления инактивированной вакцины [Текст] / Е.О. Абдураимов // I ежегодная конф. Ассоциации Биол. Безопасности Центр. Азии и Кавказа: "Биобезопасность и зоонозные инфекции", Алматы. 2009. – С.44.

19. Абдураимов, Е.О. Қойдың инфекциялы катаральды қызбасы – Қазақстан үшін жана індет [Текст] / К.Д. Жугунисов, Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев // Биотехнология. Теория и практика. Астана. 2009. № 3. – С. 34-39.

20. Абдураимов, Е.О. Результаты мониторинга катаральной лихорадки овец в Центральной Азии и Казахстане [Текст] / Е.О. Абдураимов, Е.М. Раманкулов, С.М. Мамадалиев, Ж.К. Кошематов, З.Д. Ершебулов // Межд.науч.-практ. конф. «Перспективы сотрудничества государств членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней», Новосибирск. 2009. – С. 49-52.

21. Абдураимов, Е.О. Применение различных адъювантов для получения антивидовой антиовечьей сыворотки [Текст] / А.Ж. Ажибаев, Ж.К.Кошематов, С.М. Мамадалиев, С.Ш. Нурабаев, В.М. Матвеева, А.А. Бурабаев, Е.О.

Абдураимов, К.Д. Жугунисов // Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии имени А. Дуйшеева. Журнал Вестник. Бишкек. 2010. №3. – С. 38-41.

22. Абдураимов, Е.О. Определение оптимальных параметров культивирования вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, К.Д. Жугунисов, З.Д. Ершебулов // Биотехнология. Теория и практика. Астана. 2010. №4. – С. 88-91.

23. Абдураимов, Е.О. Қойдың катаралды безгегінің вирусын әртүрлі жүйелерде өсірудің ерекшеліктері [Текст] / Қ.Д. Жүгінісов, Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов // Ізденістер, нәтижелер – Исследования и результаты КазНАУ. Алматы. 2010. №3(047). – С. 44-47.

24. Пат. 24882 Казахстан, 2010/1402.1 Способ культивирования вируса катаральной лихорадки овец роллерным методом [Текст] / Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Ж.К.Кошеметов, С.Ш. Нурабаев, А.Ж. Ажибаев; Опубликовано 15.11.2010г.

25. Абдураимов, Е.О. Приготовление культурального антигена вируса блютанга для непрямого варианта иммуноферментного анализа [Текст] / А.Ж. Ажибаев, Кошеметов Ж.К., Мамадалиев С.М., Нурабаев С.Ш., Матвеева В.М., Бурабаев А.А., Абдураимов Е.О., Жугунисов К.Д. // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. С.-Петербург, 2011. №1. – С. 28-33.

26. Абдураимов, Е.О. Изучение иммуногенных свойств экспериментальной инактивированной вакцины против 4 серотипа вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Қ.Д. Жугунисов, Е.О. Абдураимов, Қ.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Д.У. Кишкенебаева, Ж.Ж. Саметова // Мат. II межд. науч.-практ. конф. «Астана Биотех». Астана. 2011. – С. 124.

27. Абдураимов, Е.О. Выбор эффективного инактиванта и оптимизация условий инактивации вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Қ.Д. Жугунисов, Е.О. Абдураимов, Ж.К. Кошеметов, С.Ш. Нурабаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина. Астана. 2011. №2(69). – С. 35-41.

28. Пат. 26354 Казахстан, 2011/0685.1 Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, К.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов; Опубликовано 21.06.2011г.

29. Пат. 26355 Казахстан, 2011/0782.1 Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной моновалентной против катаральной лихорадки овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, К.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов; Опубликовано 11.07.2011г.

30. Абдураимов, Е.О. Қойдың катаралды безгегі вирусының 4 және 16 серотиптеріне қарсы инактивтелген моновалентті вакциналардың иммундық белсенділігі мен зиянсыздығын зерттеу [Текст] / Қ.Д. Жүгінісов, Е.О. Абдураимов, Қ.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов. Ж.Ж. Саметова // КазНАУ Ізденістер, нәтижелер., Алматы. 2012. №1. – С. 16-22.

31. Абдураимов, Е.О. Культивирование вируса катаральной лихорадки овец в развивающихся куриных эмбрионах [Текст] / З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Б. Баракбаев, Е.О. Абдураимов, А.Р. Сансызбай // Мат. междунауч.-практ. конф. «Современные проблемы борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных» посвященной 70-летию профессора Н.Асанова, Том I. Алматы. 2012. – С. 47-50.

32. Абдураимов, Е.О. Қойдың катаральды қызбасына экспериментальды вакцинаның иммундық дозасын анықтау [Текст] / Қ.Д. Жүгінісов, Е.О. Абдураимов, Қ.Б. Баракбаев, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов // Мат. междунауч.-практ. конф. «Современные проблемы борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных» посвященной 70-летию профессора Н.Асанова, Том I. Алматы. 2012. – С. 50-52.

33. Абдураимов, Е.О. Подбор оптимальной стабилизирующей среды при изготовлении ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Ж. Аманова, Д.С. Таранов, З.Д. Ершебулов, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондыбаева, К.Б. Баракбаев, Е.О. Абдураимов, А.Р. Сансызбай // Мат. междунауч. конф. молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности» посвященный 55-летию НИИПББ. Гвардейский. 2013. – С. 17-28.

34. Абдураимов, Е.О. Принципиальная возможность аттенуации штаммов вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Ж.Ж. Саметова, З.Д. Ершебулов, Ж. Аманова, Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондыбаева, К.Б. Баракбаев, А.Р. Сансызбай // Мат. междунауч. конф. молодых ученых «Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности» посвященный 55-летию НИИПББ. Гвардейский. 2013. – С.172-181.

35. Пат. 28903 Казахстан, 2013/1283.1 Способ изготовления ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец [Текст] / Е.О. Абдураимов, А.Р. Сансызбай, К.Б. Баракбаев, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондыбаева, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.Т. Аманова, Ж.Ж. Саметова; Опубликовано 30.09.2013г.

36. Пат. 28923 Казахстан, 2013/1344.1 Штамм «Хуросон-40/13/4» 4 серотип вируса катаральной лихорадки овец, для приготовления диагностических и профилактических препаратов [Текст] / Е.О. Абдураимов, А.Р. Сансызбай, К.Б. Баракбаев, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондыбаева, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.Т. Аманова, Ж.Ж. Саметова; Опубликовано 16.10.2013г.

37. Пат. 28924 Казахстан, 2013/1345.1 Штамм «RT/RIBBSP-40/13/16» 16 серотип вируса катаральной лихорадки овец, для приготовления диагностических и профилактических препаратов [Текст] / Е.О. Абдураимов, А.Р. Сансызбай, К.Б. Баракбаев, Е.А. Булатов, Ж.Б. Кондыбаева, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.Т. Аманова, Ж.Ж. Саметова; Опубликовано 16.10.2013г.

38. Abduraimov, Ye. Peste des petits ruminants: Monitoring, diagnostic and spread on the territory of the Central Asia [Текст] / Zh. Koshemetov, A. Sansyzbay, N. Sandybaev, V. Matveyeva, S. Nurabaev, Ye. Abduraimov, M. Bogdanova, G. Sugirbaeva // Life Science Journal. China. 2014. 11(7).

39. Abduraimov, Ye. Study of cultural characteristics and interference of Peste des petites ruminants virus and Sheep pox virus in co-culture [Текст] / D. Taranov, Z. Yershebulov, K. Zhugunissov, Ye. Bulatov, K. Barakbaev, Zh. Kondibaeva, A. Sansyzbai // Life Science Journal. China. 2014. 11(9).

40. Абдураимов, Е.О. Безвредность вакцины против катаральной лихорадки овец [Текст] / К.Д. Жугунисов, З.Д. Ершебулов, Е.А. Булатов, Е.О. Абдураимов, К.Б. Баракбаев, Д.С. Таранов, Ж. Саметова // Вестник Семипалатинского государственного университета им.Шакарима. Семипалатинск. 2014. №3(67) – С. 234-238.

41. Абдураимов, Е.О. Атенуация штаммов вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Ж. Аманова, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, Е.А. Булатов, А.Р. Сансызбай // Российский ветеринарный журнал. Москва. 2015. №4. – С. 24-25.

42. Abduraimov, Ye. Duration of protective immunity after a single vaccination a live attenuated bivalent bluetongue vaccine [Текст] / Zhugunissov K., Yershebulov Z., Taranov D., Amanova J., Barakbaev K., Abduraimov E. // Veterinary Research Communications. Netherlands. 2015. Vol. 39(4). - P. 203-210. (Thompson Reuters - IF-1.236).

43. Абдураимов, Е.О. Антивидовые сыворотки для приготовления видоспецифических конъюгатов [Текст] / И.Т. Саттори, Г.Ю. Бобоев, Ж.К. Кошеметов, Р.З. Нургазиев, А.В. Сухоруков, Е.О. Абдураимов // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. Душанбе. 2015. №4 (46). – С. 44-47.

44. Абдураимов, Е.О. Диагностические сыворотки при чуме мелких жвачных животных [Текст] / И.Т. Саттори, Ш.А. Турдиев, Ш.Н. Джумаев Ж.К. Кошеметов, Р.З. Нургазиев, А.В. Сухоруков, Е.О. Абдураимов // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. Душанбе. 2015. №4 (46). – С. 55-58.

45. Abduraimov, Ye. Surveillance and control of Bluetongue in Kazakhstan [Текст] / Ye. Abduraimov, A. Sansyzbai, N. Sandybaev, M. Orynbaev, Zh. Koshemetov // International Conference «Biodefense and Emerging Diseases» American society of microbiologists. Arlington, USA, 2016.

46. Абдураимов, Е.О. Изучение иммунобиологических свойств вакцины против чумы мелких жвачных животных [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, К.Д. Жугунисов, Е.А. Булатов, Д.С. Таранов, Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. Барнаул. 2016. №2 (136). – С. 121-124.

47. Абдураимов, Е.О. Мониторинг по вирусным инфекциям животных на территории Республики Таджикистан и Кыргызской Республики в 2014 году

[Текст] / Ж.К. Кошеметов, Е.О. Абдураимов, М.И. Богданова, Г.Д. Сугирбаева, В.М. Матвеева, С.Ш. Нурабаев, А.Р. Сансызбай // Вестник Красноярского государственного аграрного университета, Красноярск. 2016. №3. – С.171-179.

48. Абдураимов, Е.О. Получение вируса чумы мелких жвачных в культуре клеток MDBK на микроносителях [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Ж.К. Кошеметов, Е.А. Булатов // Вестник ветеринарии. Ставрополь. 2016. №1 (76) – С. 43-46.

49. Абдураимов, Е.О. Безопасность и иммуногенность живой аттенуированной бивалентной вакцины против блютанга на мышах и овцах [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, К.Д. Жугунисов, Д.С. Таранов, Ж.К. Кошеметов, Е.А. Булатов // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. Красноярск. 2016. №3. – С. 162-171.

50. Абдураимов, Е.О. Результаты исследований биологических проб с подозрением на чуму мелких жвачных и вакцинация животных в очаге инфекции [Текст] / Е.О. Абдураимов, Ж.К. Кошеметов, М.И. Богданова, Г. Сугирбаева, Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская // Вестник Кыргызского государственного аграрного университета. Бишкек. 2016. №1. – С. 103-107.

51. Абдураимов, Е.О. Изучение иммуногенных свойств бивалентной эмульгированной инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец [Текст] / Р.З. Нургазиев, Е.О. Абдураимов // Вестник Кыргызского государственного аграрного университета. Бишкек. 2016. №1. – С. 128–134.

52. Абдураимов, Е.О. Сравнительные исследования иммуногенности вакцин против чумы мелких жвачных [Текст] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, К.Д. Жугунисов, Д.С. Таранов, Ж.К. Кошеметов, Е.А. Булатов // Вестник ветеринарии. Ставрополь. 2016. №3 (78) – С. 54-59.

Абдураимов Ергали Орынбасаровичтин «Кой-эчкилердин кара тумоо жана койдун катардуу калтыратма ыландарынын иммунопрофилактикасы жана вакциналарды даярдоо технологиялары» темасында ветеринария илимдеринин доктору даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02 – ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: кара тумоо, блютанг, клеткалардын культурасы, технология, алдын алуу, штамм, инактивацияланган вакцина, иммуногендүүлүк.

Изилдөөнүн объектиси: кой-эчкилердин кара тумоо жана койдун катардуу калтыратма ыландарынын вирустарынын штаммдары, тооткучтуу

кой-эчкилер, кой-эчкилердин кара тумоосунун тирүү жана койдун катардуу калтыратмасынын инактивацияланган вакциналары.

Иштин максаты: кой-эчкилердин кара тумоо ыланына каршы вирусвакцинаны даярдоо технологиясын иштеп чыгуу жана койдун катардуу калтыратма ыланына каршы инактивацияланган вакцинаны даярдоо технологиясын иштеп чыгуу.

Изилдөөнүн ыкмалары: биотехнологиялык, вирусологиялык, серологиялык, зыянсыздыгы, иммуногендүүлүк.

Алынган натыйжалар жана алардын жанычылыгы: Казахстан Республикасында биринчи жолу Таджикистан Республикасынын жаныбарларынын патологиялык материалдарынан "RT/RIBSP-07/16" (16 серотип) штаммы жана койлордун катаралдык лихорадка вирусунан "Хуросон-07/4" (4 серотип) бөлүнүп алынган жана алардын иммунобиологиялык касиеттери изилденген. Вирустук биомассаны алууда клетка культураларын колдонуу эксперименталдык жактан негизделди жана изилденди, о.э алардын вакцина жасоодо колдонуунун перспективдүүлүгү жана максаттуулугу технологиялык жактан аныкталды. Вирустук биомассаны ар кандай ыкма менен алуу методу (стационардык, роллердик, суспензиондук жана микроносителдерде), технологиялык жактан бааланды. Лиофилизация ыкмасы менен кой-эчкилердин кара тумоо жана койдун катардуу калтыратма ыландарына каршы кургак вакциналарды алууда стабилизациялоочу кошумчаларды колдонуу негизделди жана тандалып алынды.

Койдун катардуу калтыратма ыланынын вирусун инактивациялоонун жаны режими аныкталды жана моновакцинаны конструкциялоонун жаны принциптери сунушталды. Койдун катардуу калтыратма ыланына каршы инактивацияланган биваленттик вакцинаны даярдоодо жаны адьюванттарды колдонуу жана тирүү вакциналарды түзүүдө жаны принциптер сунушталды.

Койдун катардуу калтыратма вирусунун жаны аттенуацияланган штаммы алынды жана анын иммунобиологиялык касиеттери изилденди. Койдун катардуу калтыратма ыланына каршы тирүү биваленттик вакцинанын эксперименталдык сериясы даярдалды.

Казахстан Республикасында биринчи жолу кой-эчкилердин кара тумоо жана койдун катардуу калтыратма ыландарына каршы вакциналарды даярдоодо, даярдоо технологиясы иштелип чыкты жана практика жүзүндө ишке ашырылды.

Колдонуу чөйрөсү: биотехнология, вирусология, ветеринардык практика.

РЕЗЮМЕ

диссертации **Абдураимова Ергали Орынбасаровича** на тему: «Технология производства вакцин и иммунопрофилактика чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец» на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: чума мелких жвачных, блутанг, культура клеток, технология, профилактика, штамм, инактивированная вакцина, иммуногенность.

Объект исследования: штаммы вируса чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец, восприимчивые овцы и козы, вакцины живая против чумы мелких жвачных животных и инактивированные и живые против катаральной лихорадки овец.

Цель работы: разработка технологии изготовления и организация производства вирусвакцины против чумы мелких жвачных животных и разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец.

Методы исследования: биотехнологический, вирусологический, серологический, безвредность, иммуногенность.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Республике Казахстан из патологических материалов, взятых от животных в Республике Таджикистан выделены штаммы "RT/RIBSP-07/16" (16 серотип) и "Хуросон-07/4"(4 серотип) вируса катаральной лихорадки овец и изучены их иммунобиологические свойства. Изучены и экспериментально обосновано применение культур клеток в получении вирусной биомассы и технологически доказаны перспективность и целесообразность их использования в приготовлении вакцин. Технологически оценены, методы наработки вирусной биомассы различными способами (стационарный, роллерный, суспензионный и на микроносителях). Подобрано и обосновано применение стабилизирующих добавок при получении сухих вирусвакцин против ЧМЖЖ и КЛЮ методом лиофилизации.

Определены новые режимы инактивации вируса КЛЮ и предложены новые принципы конструирования моновакцин. Предложены новые принципы составления живых и новые адъюванты для приготовления инактивированных бивалентных вакцин против КЛЮ.

Получены новые аттенуированные штаммы вируса КЛЮ, изучены их иммунобиологические свойства. Приготовлены экспериментальные серии живых бивалентных вакцин против КЛЮ.

Впервые в Республике Казахстан разработаны технологии изготовления и внедрены в практику вакцины против чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец.

Область применения: биотехнология, вирусология, ветеринарная практика.

SUMMARY

of Abduraimov Yergali Orynbasarovich doctoral thesis «Technology for manufacturing of vaccine and immunoprophylaxis of peste des petits ruminants and bluetongue», the specialty 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

Key words: peste des petits ruminants, bluetongue, cell culture, technology, prophylaxis, strain, inactivated vaccine, immunogenicity

Research object: strains of peste des petits ruminants virus and bluetongue, susceptible sheep and goats, live and inactivated vaccine against peste des petits ruminants and live vaccine against bluetongue.

Research aim: development of the technology for manufacturing and organization of production of virus vaccine against peste des petits ruminants and development of the technology for manufacturing an inactivated vaccine against bluetongue.

Research methods: biotechnological, virology, serological, innocence, immunogenicity.

The obtained results and their novelty: For the first time in the Republic of Kazakhstan "RT/RIBSP-07/16" (16 serotype) and "Khuroson-07/4" (4 serotype) strains of bluetongue virus are isolated and studied their biological characteristics from the pathological materials from animals in the Republic of Tajikistan. Application of cell cultures in production of viral biomass is studied and experimentally substantiated. Availability and suitability of their applying in vaccine manufacturing is technologically proved. Methods of production of viral biomass by different ways (stationary, roller, suspension and on microcarriers) are technologically evaluated. Applying of stabilizers for manufacturing of dried virus vaccine against peste des petits ruminants and bluetongue by lyophilization method is selected and substantiated.

New inactivation regime of bluetongue virus is identified and new approaches of monovaccine construction are suggested. New approaches of live and new adjuvants for manufacturing of inactivated bivalent vaccine against bluetongue are proposed.

New attenuated strains of bluetongue virus are obtained, their immunobiological characteristic are studied. The experimental batches of live bivalent vaccine against bluetongue are manufactured.

For the first time in the Republic of Kazakhstan technology for manufacturing is developed and vaccine against peste des petits ruminants and bluetongue is put to use.

Field of application: biotechnology, virology, veterinary practice.

Абдураимов Ергали Орынбасарович

**ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН И
ИММУНОПРОФИЛАКТИКА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ
ЖИВОТНЫХ И КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ**

Объем 2,5 уч.изд.л.
Тираж 100 экз. Заказ № ____
Типография ОсОО «Алтын Принт»
720000, г.Бишкек, ул. Орозбекова, 44
Тел.: (+996 312) 62-13-10
e-mail: altyntamga@mail.ru