

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

На правах рукописи
УДК 578.823.2

Жугунисов Куандык Даулетбаевич

**Совершенствование средств профилактики и технологии приготовления
вакцины против блутанга**

03.01.06 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор,
член-корреспондент НАН КР
Жунушов А.Т.

Бишкек - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Блутанг: краткая историческая справка, распространение болезни, заболеваемость и экономический ущерб.....	13
1.2. Диагностика	15
1.3. Биологические свойства вируса.....	16
1.4. Векторная трансмиссия и переносчики вируса	20
1.5. Эпизоотическая ситуация по БТ в мире и Казахстане.....	22
1.6. Противоэпизоотические мероприятия при БТ.....	24
1.7. Средства специфической профилактики БТ и их эффективность ...	26
1.8. Производственные штаммы ВБТ для приготовления вакцин	32
1.9. Субстраты для культивирования ВБТ.....	33
1.10. Инактиванты и способы инаktivации ВБТ при производстве вакцин.....	35
1.11. Адьюванты в составе противовирусных вакцин.....	38
1.12. Заключение по обзору литературы.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Материалы и оборудование.....	45
2.2. Методы исследований.....	50
2.2.1. Сбор полевых материалов от сельскохозяйственных животных.	50
2.2.2. Подготовка проб для исследований.....	51
2.2.3. Суспензионное культивирование клеток.....	51
2.2.4. Культивирование ВБТ суспензионным методом.....	52
2.2.5. Определение инфекционной активности ВБТ.....	53
2.2.6. Инаktivация вируса БТ.....	53
2.2.7. Контроль авирулентности инаktivированной вирусной	

суспензии.....	54
2.2.8. Составление эмульгированной инактивированной бивалентной вакцины.....	55
2.2.9. Контроль качества инактивированной вакцины.....	55
2.2.9.1. Определение стерильности.....	55
2.2.9.2. Контроль стабильности эмульсии.....	56
2.2.9.3. Определение кинематической вязкости.....	57
2.2.9.4. Определение концентрации водородных ионов (рН).....	57
2.2.10. Определение безопасности инактивированной вакцины.....	57
2.2.11. Определение иммуногенности инактивированной вакцины.....	57
2.2.12. Определение 50 % иммунизирующей дозы вакцины.....	60
2.2.13. Определение наличия ВНА в реакции нейтрализации.....	60
2.2.14. Конкурентный метод ИФА для выявления антител к ВБТ.....	61
2.2.15. Постановка ПЦР в реальном времени.....	62
2.2.16. Статистическая обработка результатов.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Серомониторинг животных Южного Казахстана на наличие антител к ВБТ	63
3.2. Изучение некоторых иммунобиологических свойств различных штаммов вируса блутанга, хранящихся в Коллекции микроорганизмов НИИПББ	73
3.3. Технология приготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против ВБТ.....	87
3.4. Изучение иммуногенности вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против ВБТ.....	117
3.5. Комиссионные испытания технологии изготовления вакцины и ее физических и биологических характеристик.....	143
3.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	145

ВЫВОДЫ	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	151
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	152
ПРИЛОЖЕНИЯ	174

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей диссертации применяют следующие определения, обозначения и сокращения:

БПЛ	– бета-пропиолактон
БТ	– блутанг
ВБТ	– вирус блутанга
ВБТ 4	– вирус блутанга 4-го серотипа
ВБТ 16	– вирус блутанга 16-го серотипа
ВСС	– вируссодержащая суспензия
ГОА	– гель гидроокиси алюминия
ДЭИ	– димерэтиленимин
ЕС	– Европейский Союз
КНР	– Китайская Народная Республика
КРС	– крупный рогатый скот
МДВК	– перевиваемая линия культуры клеток почки теленка
МДСК	– перевиваемая линия культуры клеток почки собаки
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
МРС	– мелкий рогатый скот
МЭБ	– Международное эпизоотическое бюро
НИИПББ	– Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
НИСХИ	– Научно-исследовательский сельскохозяйственный институт
НТД	– нормативно-техническая документация
ПО	– перевиваемая линия культуры клеток почки овцы
ПС	– перевиваемая линия культуры клеток почки сайги
ПСГК	– культуры клеток почки сирийского горного козерога
ПСП	– полусинтетическая среда, пристеночная

ПТ-80	– перевиваемая линия культуры клеток почки теленка
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЯ	– первично-трипсинизированная культура клеток почки ягнят
РДП	– реакция диффузной преципитации
РК	– Республика Казахстан
РКЭ	– развивающийся куриный эмбрион
РН	– реакция нейтрализации
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РСК	– реакция связывания комплемента
РТГА	– реакция торможения гемагглютинации
РФ	– Российская Федерация
СНГ	– Содружество Независимых Государств
СОП	– стандартная операционная процедура
США	– Соединенные Штаты Америки
СПЭВ	– перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи
ТЦД ₅₀	– 50% тканевая цитопатическая доза
ТФ-ИФА	– твердофазный иммуноферментный анализ
ЦПД	– цитопатическое действие
ЮАР	– Южно-Африканская Республика
ВНК-21	– перевиваемая культура клеток почки сирийского хомячка
EL-4	– перевиваемая линия культуры клеток лимфомы индуцированной диметилбензантраценом линии мышей M57BL/6N
FAO	– Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН
NS	– неструктурный белок вируса
Vero	– культуры клеток почки африканской зеленой мартышки
VP	– протеин вируса
lg	– десятичный логарифм
pH	– концентрация ионов водорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В последнее время, в основном в связи с импортом животных и продуктов животноводства, блутанг (БТ) животных получил широкое распространение [1]. Заболевание регистрируется во многих странах мира, в том числе в России, Китае, Иране [2-6]. В последние годы также обнаружены серопозитивные животные в Кыргызстане, Казахстане и Монголии [7-9].

По данным Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, в 2011-2014 годах в страну было ввезено более 50 000 голов КРС из зарубежных стран для реализации программы развития экспорта мяса [10]. Согласно данным МЭБ, импорт животных и животноводческой продукции из неблагополучных стран может подвергать страну-импортёра определенному риску заноса заболевания [11].

Стада КРС, дикие жвачные и домашние козы являются естественным резервуаром для вируса блутанга (ВБТ). В их организме вирус размножается, не вызывая видимых клинических признаков болезни [12, 13]. Длительная виремия (до 3 лет) у КРС обеспечивает переживание возбудителя в межэпизоотический период [12]. Наличие инфекции в сопредельных странах и серопозитивных животных повышает риск возникновения БТ на территории стран Центральной Азии.

Основным путем передачи вируса является трансмиссивный, при этом переносчиками вируса являются мелкие кровососущие семейства мокрецов, относящихся к компонентам гнуса [14]. Глубокое оздоровление неблагополучной местности, связанное с ликвидацией мокрецов и комаров, являющихся основными переносчиками вируса в природе, в настоящее время пока трудноосуществимо. Поэтому, проведение специфической профилактики заболевания у восприимчивых животных с целью предотвращения дальнейшего

распространения БТ является одной из наиболее важных и сложных задач в системе противоэпизоотических мероприятий.

Для профилактики БТ животных разработаны различные типы живых вакцин, приготовленных из вакцинных штаммов, аттенуированных последовательными пассажами в куриных эмбрионах или в культурах клеток [15, 16]. Однако, несмотря на высокую эффективность живых вакцин, их не рекомендуют применять в неблагополучных по БТ странах, а также в регионах, где заболевание появилось впервые. Это обстоятельство обусловлено тем, что вакцинные штаммы при пассировании через организм переносчиков могут ревертировать и приобретать патогенную форму, вызывая при этом тяжелые формы заболевания среди невакцинированных животных [17]. Поэтому использование инаktivированных вакцин считается более безопасным и практикуется во многих европейских странах для контроля вспышек, снижения вирусемии и циркуляции вирусов [18].

В России и Европейских странах многими учеными разработаны инаktivированные вакцины против БТ [21 - 26], где в качестве инаktivанта ВБТ использован 0,1% раствор диэтиленимина и А-24. Эти вакцины успешно прошли полевые испытания на овцах и КРС. Однако эти доступные коммерческие вакцины (2, 9 и 8 серотипов) неактуальны для применения на территории Казахстана, где на сегодня циркулируют возбудители БТ 4 и 16 серотипов [122].

В НИИПББ была разработана отечественная инаktivированная бивалентная сорбированная вакцина против ВБТ 4-го и 16-го серотипов. Однако данный препарат предназначен только для овец, где продолжительность иммунитета у вакцинированных животных составляет шесть месяцев [19]. В соответствии с предъявляемыми требованиями МЭБ, вакцины против БТ должны вызывать иммунитет у привитых животных продолжительностью не менее года, что обосновано с биологической активностью сезона москитов в неблагополучных и угрожаемых районах [20].

В связи с этим, задачей наших исследований являлось совершенствование технологии изготовления инактивированной бивалентной вакцины против БТ 4 и 16 серотипов и изучение её иммуногенной эффективности на КРС и МРС.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями.

Диссертационная работа выполнена в РГП НИИПББ КН МОН РК в рамках республиканских научных грантов № ГР 0109РК00450 (**Приложение 1**); № ГР 0112РК00306 (**Приложение 2**) Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, а также в рамках международного проекта KZ-32 «Prevalence of *Brucella* species and bluetongue virus serotypes among domestic livestock or ruminants in Southern Kazakhstan» в 2016-2018 гг.

Цель исследований. Проведение исследований по совершенствованию технологии приготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против БТ и изучение ее иммунобиологических свойств на КРС и МРС.

Задачи исследования:

1. Изучение эпидемиологической ситуации в южных регионах Казахстана на наличие антител к ВБТ среди восприимчивых животных;
2. Выбор культуры клеток и совершенствование условий суспензионного культивирования ВБТ;
3. Совершенствование режима инактивации ВБТ бета-пропиолактоном (БПЛ);
4. Совершенствование адьювантного состава и изготовление экспериментальных серий инактивированной вакцины;
5. Определение иммунизирующей дозы, кратности и метода введения совершенствованной вакцины, а также напряженности и продолжительности иммунитета у МРС и КРС;

б. Изучение срока годности и стабильности вакцины при различных температурно-временных режимах;

Проведение комиссионных испытаний технологии приготовления вакцины, разработка и утверждение нормативно-технической документации (НТД).

Научная новизна работы. Впервые в южном регионе Казахстана проведен серомониторинг с полным охватом сельскохозяйственных животных для раннего выявления инфекции и быстрого реагирования. В результате проведенных исследований определен эпидемиологический статус БТ в Казахстане, с упором на изучение способов передачи и устойчивости БТ в окружающей среде.

Впервые в Казахстане разработана технология изготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против ВБТ 4-го и 16-го серотипов с использованием нового коммерческого масляного адьюванта Montanide™ ISA-71VG, изучены его иммунобиологические свойства на КРС и МРС, а также дана оценка ее протективной эффективности.

Определены вирусрепродуцирующие и технологические характеристики перевиваемых клеточных культур ВНК-21/17 и Е1-4, выращенных суспензионным методом. По результатам исследований выбрана культура клеток ВНК-21, позволяющая получать вирус с более высокой биологической активностью (**Приложение 3**).

В результате проведенных экспериментов подобраны оптимальные параметры инактивации ВБТ с применением БПЛ, максимально сохраняющие его антигенную активность.

Новизна исследований подтверждена 5 авторскими свидетельствами на изобретения, выданные Комитетом по правам интеллектуальной собственности МЮ РК (№№63210, 63307, 71197, 75809, 75814, **Приложения 4-8**);

Практическая значимость работы. По результатам проведенных исследований усовершенствована существующая технология и разработана

бивалентная инактивированная эмульгированная вакцина против ВБТ из вирулентных штаммов, позволяющая получать высокоиммуногенную, безопасную и эффективную бивалентную вакцину для КРС и МРС. Оформлена и утверждена нормативно-техническая документация (НТД) на профилактический биопрепарат (вакцина) (**Приложение 9**).

Экономическая значимость полученных результатов. Внедрение вакцины в практику позволит проводить иммунопрофилактические мероприятия против ВБТ, а в случае проявления немедленно ликвидировать вспышки болезни. Себестоимость 1 дозы вакцины против ВБТ по данной технологии в 7 раз меньше зарубежных аналогов и составляет 55,8 тенге.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимизация параметров суспензионного культивирования ВБТ 4 и 16 серотипов в культуре клеток ВНК-21.
2. Совершенствование режима инактивации БПЛ ВБТ.
3. Сравнительное изучение иммуностимулирующих свойств ГОА с сапонином и нового коммерческого масляного адъюванта Montanide™ ISA-71VG в составе инактивированной бивалентной вакцины против БТ.
4. Иммуногенной эффективности бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против ВБТ на КРС и МРС.

Личный вклад. Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора. Отдельные этапы исследований по проведению мониторинговых исследований, культивированию ВБТ суспензионным методом и инактивации ВБТ проведены совместно с магистрами биологии Ершебуловым З.Д., Тарановым Д.С. и доктором ветеринарных наук Абдураимовым Е.О., за что автор выражает им свою признательность.

Апробация и публикация результатов исследований. Основные материалы диссертации доложены на международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования НИИПББ (г. Алматы, 2008 г.), I-ой международной конференции Астана BioTech (г. Астана, 2008 г.), IV

международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии", (г. Павлодар, 2008 г.), II-ой международной конференции Астана BioTech (г. Астана, 2011 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными, эпизоотическими и зооантропонозными болезнями животных» посвященной 70-летию профессора Н.Асанова, (г. Алматы, 2012 г.).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. Результаты исследований опубликованы в 11 научных работах, из них 2 статей в журналах входящих в РИНЦ, 1 статьи в журнале, рецензируемом Thomson Reuters и 3 статьи в Перечне рецензируемых научных изданий, утвержденных президиумом ВАК Кыргызской Республики.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 195 страницах и содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты собственных исследований и их обсуждение, Выводы и Приложения. Список использованной литературы включает 199 источников, в том числе 121 работа зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 29 таблицами. В 10 приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность проведенных исследований.

Автор выражает искреннюю благодарность профессору, д.в.н. член-корреспонденту НАН КР Жунушову А.Т., д.в.н. Абдураимову, д.б.н. Кошеметову Ж.К., магистрам биологии и ветеринарии Ершебулову З.Д., Таранову Д.С. за консультативную и практическую помощь в выполнении отдельных этапов работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Блутанг: краткая историческая справка, распространение болезни, заболеваемость и экономический ущерб

Блутанг (*Bluetongue*, *катаральная лихорадка овец*) – вирусная, трансмиссивная болезнь жвачных животных, характеризующаяся воспалительно-некротическими поражениями слизистой оболочки ротовой полости, желудочно-кишечного тракта, а также дистрофией, изменениями скелетной мускулатуры [27-32]. По классификации МЭБ, блутанг (БТ) относится к категории особо опасных болезней для всех видов животных [11].

БТ впервые зарегистрирован в Южной Африке в 1876 г. комиссией по болезням КРС и МРС [33]. Первые клинические симптомы БТ были описаны в 1880 году в годовом отчете D. Hutcheon главного ветеринарного офицера Колонии в Южной Африке. В 1933 г. болезнь диагностировали и у КРС. В 1905 году A. Theiler открыл возбудитель, установив его фильтрующуюся природу [34-37]. Gutsche T. писал, что первое упоминание о БТ у овец и КРС было сделано французским зоологом Francois de Vaillant, путешествовавшим в 1781-1784 годах по мысу Good Hoop (Южная Африка) [35, 37]. Он называл её на французском языке «*Tong-sikte*». Однако в научной статье Hutcheon D. в 1902 году данная болезнь была впервые упомянута под названием «*малярийная катаральная лихорадка*» [36, 37]. Автор подразумевал, что инфекционным агентом при заболевании является передающийся насекомыми плазмодий.

Spreull (1905) написал в своём отчёте, что данное заболевание распространено только в Южной Африке. В типичных случаях заболевания

среди овец он отмечал сильную непрерывную лихорадку в течение 5-7 дней, а самые значительные поражения обнаруживал в ротовой полости - воспалительно-некротические поражения слизистых оболочек, язык приобретал темно-синий цвет, что и определило название болезни. После чего он предложил вместо слова «*malarial*», использовать термин «*Bluetongue*» [37, 38].

В первых сообщениях о заболевании овец с симптомами БТ в Южной Африке 1876 г. отмечено о поражении овец местных пород с частым бессимптомным течением. С завозом в Африку высокочувствительных овец европейских пород заболевание приняло злокачественный характер. С 1943 г. болезнь стали регистрировать во многих странах [31]. В последнее 15 лет болезнь глобально распространилась, периодически проявляясь в виде массовых эпизоотий среди восприимчивых животных. Анализ эпизоотической ситуации по БТ в мире за последние годы [39] свидетельствует о том, что ареал инфекции постоянно расширяется. По данным МЭБ, если в 1996 г. болезнь регистрировали в 13 странах Африки, а спустя 10 лет – инфекция отмечена в более чем 80 странах Западного и Восточного полушария [39, 43].

При занесении болезни на благополучную территорию возникают стационарные очаги, обусловленные циркуляцией вируса в организме переносчиков и хозяев, включая домашних и диких животных. Ареал постоянно расширяется, распространяясь на северные регионы и охватывая новые страны и континенты [44-50].

Степень проявления клинических признаков болезни в различных очагах неодинакова и зависит от вирулентности вируса, породной и индивидуальной чувствительности животных, условий их содержания, кормления и ухода за ними [51-53].

В естественных условиях к вирусу восприимчивы овцы, крупный рогатый скот, олени, верблюды, буйволы, козы и некоторые виды диких

жвачных. В связи с большим разнообразием выраженности отдельных симптомов, клиника БТ у овец может сильно варьировать. Чаще всего наблюдаются abortивные формы, которые протекают в виде кратковременного повышения температуры тела. При возникновении БТ на ранее благополучных территориях заболеваемость достигает 90 %, летальность 70-90 %, а в стационарных очагах гибель среди овец составляет от 2 до 30%. [39, 54-58].

1.2. Диагностика

Диагноз на БТ ставят на основании данных эпизоотологического, клинического и патологоанатомического обследований, а также результатов лабораторных исследований - выделение вируса из органов и тканей больных особей, или обнаружение вирусспецифических антител в сыворотке крови больных животных. Выделенный вирус идентифицируют в реакции нейтрализации (РН) с типоспецифическими сыворотками. В неясных случаях используют заражение 3-6 мес. овец с исследованием сыворотки крови в реакции связывания комплемента (РСК) до инфицирования и через 21-30 дней после. Серологическая диагностика БТ важна при исследовании в очагах болезни и для выявления возможных носителей вируса в районах, где заболевание у восприимчивых животных клинически не выражено. Для ретроспективной диагностики болезни используют РН, РСК, реакцию диффузионной преципитации (РДП), метод флюоресцирующих антител (МФА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ТФ-ИФА) [4, 20, 27 – 32, 56 - 58]. Лабораторное подтверждение основано на изоляции вируса в эмбриональных куриных яйцах, культурах клеток млекопитающих и на идентификации вирусной РНК с помощью ПЦР. Для выделения вируса кровь (10-20 мл) собирают как можно раньше от фебрильных животных в антикоагулянте, таких как гепарин, цитрат натрия или ЭДТА и

транспортирует в лабораторию при температуре 4 °С. Для длительного хранения, когда охлаждение невозможно, кровь собирается в оксалат-фенолглицерине. Кровь, подлежащую замораживанию, следует собирать в буферном лактозовом пептоне и хранить при температуре ниже -70 °С. Кровь, собранную в более поздние периоды в течение вирусемического периода, не должна быть заморожена, поскольку лизирование эритроцитов при оттаивании высвобождает связанный с клеткой вирус, который затем может быть нейтрализован ранним гуморальным антителом. Вирус не остается стабильным в течение длительного времени при -20 °С. В смертельных случаях образцы селезенки, лимфатических узлов или костного мозга собираются и транспортируются в лабораторию при температуре 4 °С, как можно скорее после смерти [4, 20, 28, 30, 32, 56 -58]].

Серологический ответ у жвачных животных можно обнаружить через 7-14 дней после инфицирования и, как правило, пожизненно после полевой инфекции. Рекомендуемые в настоящее время серологические методы для обнаружения антител к ВБТ включают иммунодиффузию геля агара и конкурентного ИФА. Последний является критерием выбора и не обнаруживает кросс-реагирующего антитела к другим орбивирусам, особенно антителу против EHDV (эпизоотического геморрагического заболевания). Для выявления специфического антитела можно использовать различные формы теста нейтрализации сыворотки, включая редукцию бляшек, ингибирование бляшек и нейтрализацию микротитра [29, 31, 57, 58].

1.3. Биологические свойства вируса

Систематическое изучение ВБТ было начато в 1905 году Тейлором (Theiler) [34]. Ему впервые удалось экспериментально воспроизвести болезнь у овец путём введения, им фильтрованного материала и этим показать

заразную природу возбудителя заболевания. По современной таксономии вирус относится к семейству *Reoviridae*, роду *Orbivirus* [59].

Вирион ВБТ состоит из центрального ядра, содержащего рибонуклеиновую кислоту (РНК), капсида, который имеет кубическую симметрию, представляет собой двадцатигранник, сформированный из 32 капсомеров [55-58].

Характерным свойством ВБТ является устойчивость его к эфиру, хлороформу, дезоксихалату натрия. При рН ниже 6 вирус инактивируется при 37 °С в течение 1 мин. Вирус стабилен при рН 6,5-8,0, достаточно устойчив в щелочной среде. Вирус в лиофильно высушенном состоянии с применением соответствующих протективных стабилизаторов сохраняется в течение нескольких лет как при минус 20 °С, так и при 4 °С.

При медленном замораживании до минус 10 и 20 °С вирус разрушается, но выживает при более низких температурах. Устойчивость ВБТ зависит в значительной мере от физико-химических свойств среды, в которой он находится. Известен факт обнаружения вполне активного вируса в пробах крови, хранившихся 25 лет при комнатной температуре в оксалат-глицерин-феноловом растворе [60, 61].

Детальные исследования процесса сохраняемости ВБТ показали, что при определённых условиях инактивация патогена может проходить быстрее. Так, вирус, содержащийся в суспензии, приготовленной из зараженных куриных эмбрионов, теряет 50 % своей инфекционности уже через месяц хранения при комнатной температуре. При температуре 37 °С инфекционность его снижается за 24 ч, при 46 °С – на 90 % за 1 ч. При 56 °С за 15 мин инактивируется 99 % вируса. Прогревание при 60 °С приводит к полной инактивации его в течении 30 мин [57-61]. Термостабильность ВБТ зависит от штаммовых особенностей, среды суспендирования и наличия в ней стабилизаторов [62].

Одним из способов длительного сохранения вирулентности является метод лиофилизации вируса [63]. Лиофильно высушенные материалы с ВБТ лучше сохраняются при температуре от минус 20 °С до минус 70 °С [64]. Оптимальной зоной рН для ВБТ является 6,3-8,0. Изменение рН за эти пределы ведёт к необратимой потере инфекционности [61-64].

На данный момент известно 27 серотипов вируса [65], не создающих у овец перекрёстного иммунитета, антигенную классификацию которых проводят при помощи перекрёстной реакции нейтрализации [57]. Все серотипы данного вируса обладают семью структурными (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7), которые обеспечивают структуру вируса и тремя неструктурными (NS1, NS2 и NS3) протеинами, которые производятся только во время инфекции (рис. 1.1) и различаются между собой по вирусному протеину VP2, который уникален для каждого серотипа.

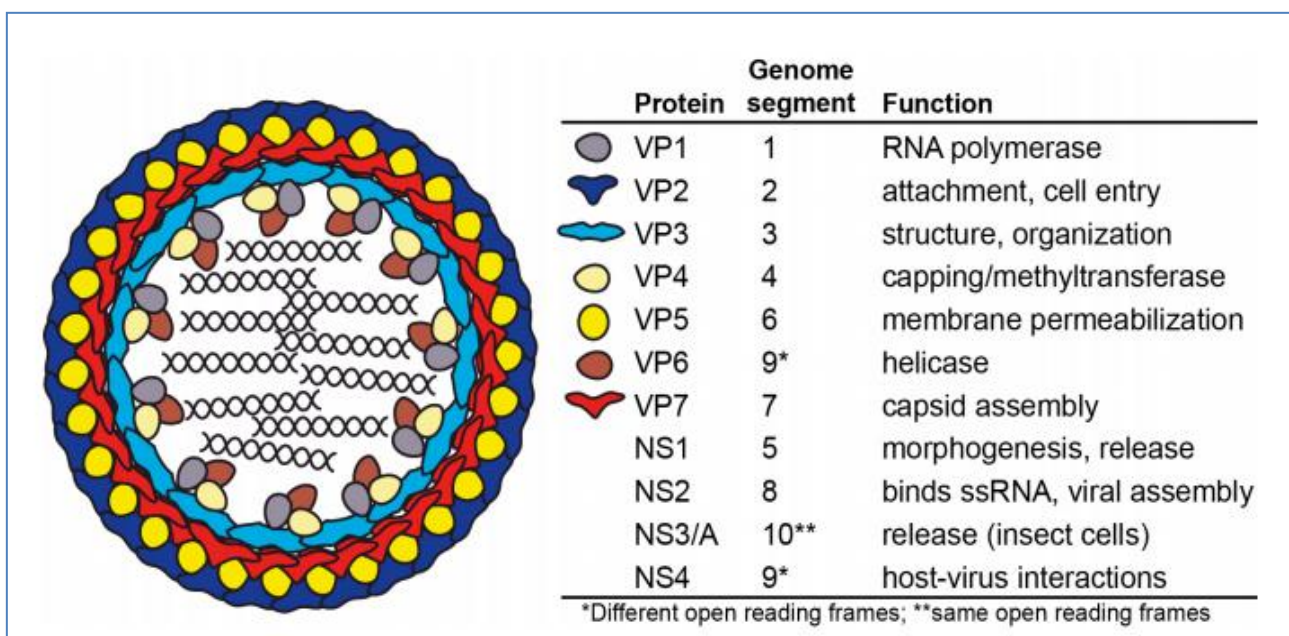


Рис. 1.1. Схематическая иллюстрация вириона БТ

VP2 расположен на поверхности вириона и обладает антигенными детерминантами, ответственными за серотипическую специфичность, нейтрализацию и иммунитет [57].

Протеин VP7 определяет групповую специфичность, VP5 – ответственный за адсорбцию. Протеин VP4 является второстепенным компонентом внутреннего ядра вируса и его функция еще не известна. Три различных неструктурных белка (NS1, NS2 и NS3) были обнаружены в ВБТ-инфицированных клетках. Два основных неструктурных белка, NS1 (P5A) и NS2 (P6A), впервые были идентифицированы Huismans (1979) [66]. Третий минорный неструктурный белок NS3, был впервые обнаружен Gorman и др. (1981) в ВБТ-инфицированных клетках [67]. Неструктурный белок NS1 является очень высоко консервативным серогруппы БТ [68]. Функция второго крупного, неструктурного белка NS2 не ясна. Третий неструктурный белок NS3 является самым маленьким и кодируется из ВБТ сегменты генома [69-73]. Информация по протеинам ВБТ приведена в табл. 1.1.

Таблица 1.1 – Протеины ВБТ (по Н. Huismans, 1990) [71]

Протеин	Кодирующие сегменты	Локализация	Молекулярная масса (дальтон)	Общие структурные протеины (%)
VP1	1	Ядро	149 588	2,0
VP2	2	Наружный капсид	111 023	22,7
VP3	3	Ядро	103 326	16,2
VP4	4	Ядро	76 433	0,9
VP5	6	Наружный капсид	59 163	20,1
VP6	9	Ядро	35 750	2,8
VP7	7	Ядро	38 548	34,9
NS1	5	Инфицированная клетка	64 445	Нет данных
NS2	8	Инфицированная клетка	40 999	Нет данных
NS3	10	Инфицированная клетка	25 602	Нет данных

1.4. Векторная трансмиссия и переносчики вируса БТ

Переносчики БТ – мокрецы и комары обитают в условиях теплого и влажного климата, удовлетворяющего их биологическому развитию: в долинах рек и крупных озер, в болотах, зарослях дикого и полудикого ландшафта. На данный момент вирус присутствует везде, где есть его биологические переносчики *Culicoides spp.* (Африка, Америка, Австралия, многие страны Южной Азии и Океании) (рис.1.2 В).

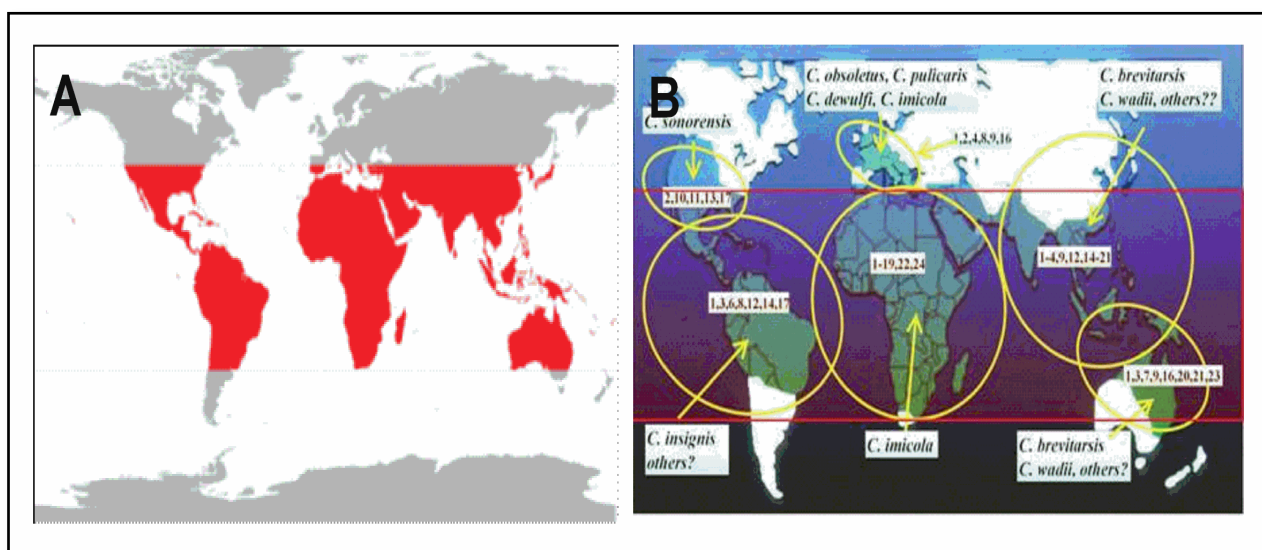


Рис.1.2. А - Карта глобального диапазона распространения ВБТ до 1998 года [81]. В - Глобальный нозоареал БТ — переносчики *Culicoides spp.* и серотипы вируса [79].

Из 1250 их видов 30 обладают векторной компетентностью в разной степени. Однако инфекция в клинически выраженной форме стационарно наблюдается только в отдельных странах (США, некоторые африканские страны). В глобальную экологию БТ вовлечены до 20 известных видов *Culicoides*. Признанными переносчиками инфекции являются *C. imicola* в Африке и в зоне Средиземноморья, *C. sonorensis* в Северной Америке, *C. insignis* и *C. pusillus* в Южной Америке, *C. brevitarsis* в Австралии. При первичном распространении болезни на юге Европы *C. obsoletus* и *C. scoticus*

были зарегистрированы в центральной Италии, *C. pulicaris* — в Сицилии. Переносчиком ВБТ-8 в северо-западной Европе признан *C. Dewulfi* [72-75]. Векторы заражаются ВБТ, выпитывая кровь от инфицированных животных. По самым общим представлениям, одна самка *Culicoides* поглощает ~ 0.001 мл крови, то есть вдвое больше своего объема и массы тела. После инъекционного заражения вирус через первичную кратковременную вирусемию распространяется по организму в регионарные лимфоузлы и там размножается. Затем, в течение вторичной вирусемии, поражаются уже патогенетические мишени – фагоцитирующие клетки эндотелия сосудов, макрофаги и дендритные клетки различных органов. Вирус также размножается в моноцитах и лимфоцитах крови, адсорбируется на эритроцитах и тромбоцитах, проникает в них за счет инвагинаций мембран. Выражается числом заражающих укусов инфицированными переносчиками на протяжении их жизненного цикла (для *Culicoides* обычно 2-4 недели) (рис. 1.3.) [72-80].

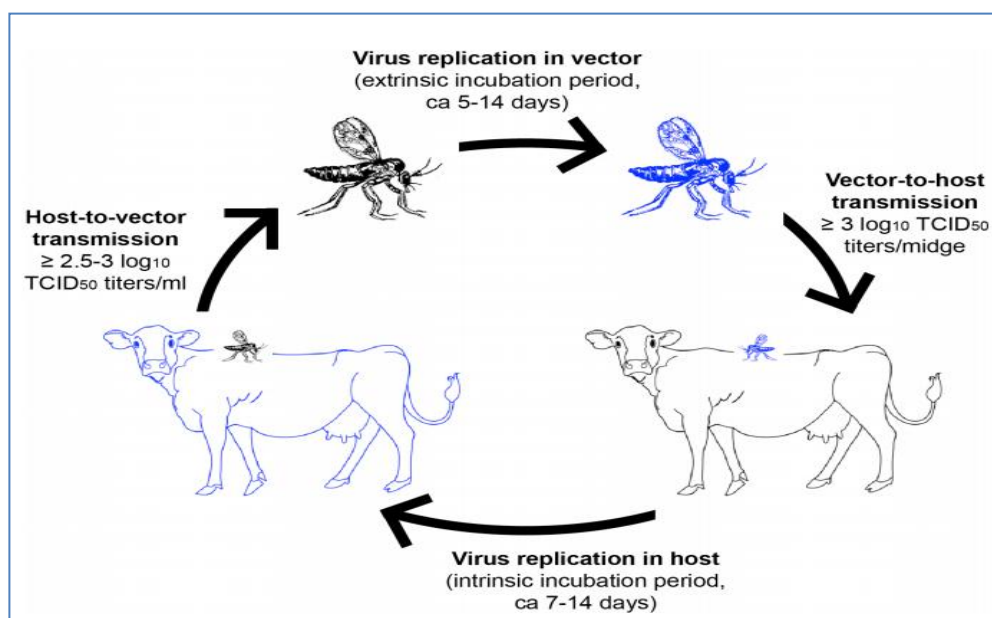


Рис. 1.3. Цикл передачи ВБТ

Таким образом, укоренение БТ, амплификация и формирование новых нозоареалов определяется комплексом неальтернативных факторов, таких как наличие, численность, распределение восприимчивых животных, продолжительность и титры вирусемии у хозяев, векторная видовая компетентность и способность популяций *Culicoides* местных видов, благоприятные биоклиматические условия (температура, влажность). В частности, процесс существенно зависит от достаточного числа переносчиков, которые инфицируются при кровососании на вирусемичных теплокровных хозяевах и живут продолжительное время, требуемое для обеспечения внешнего инкубационного периода (4-20 дней, вариации зависят от вышеописанных общих условий) и последующей эстафетной трансмиссии инфекции при укусах новых хозяев. Инфицированный вектор сохраняет способность к передаче вируса до 10 дней [72-80].

1.5. Эпизоотическая ситуация по БТ в мире и Казахстане

Анализ литературных данных свидетельствует о расширении ареала БТ в мире. В 1998-2002 гг. большая эпидемия БТ отмечалась в Средиземноморских странах и продолжалась в странах юго-западной Европы [9, 74, 75].

Нозологический ареал БТ в конце XX в. был в широкой приэкваториальной зоне, ограниченной с севера и юга 40° и 35° соответствующей широты (см. рис. 1.1. А). Географическое распространение БТ существенно расширилось вдоль 40-й параллели за счет стран южной Европы, находящихся в достаточной близости к энзоотичным регионам африканского севера. Причиной вспышек болезни могли послужить периодические заносы инфекции с инфицированными переносчиками, распространяющимися через средиземноморское пространство потоками ветров или иными способами.

В 2009 г. заболеваемость в северном направлении достигла 60-й параллели [76, 79, 80]. В 2017 г. вспышки БТ выявлены в Австрии (1), Ботсване (2), Греции (7), Италии (32), Сербии (287), Турции (2), Франции (1522), Хорватии (6), Швейцарии (2), Эквадоре (5). Сводные данные по БТ с 2015 по 2017 гг. представлены на рис. 1.4.



Рис.1.4. Страны, неблагополучные по БТ с 2015 по 2017 гг. по данным МЭБ

В период с 2015 по 2017 гг. в Австрии было выявлено 7 очагов (4 серотип) по БТ среди животных, в Боснии и Герцеговине установлено 645 случаев заболевания, в Италии обнаружено 40 очагов данного заболевания, в Кипре зафиксирован 171 очаг вспышки, в Сербии зарегистрировано 418 очагов БТ, во всех указанных очагах вспышки остаются не закрытыми. Во Франции зарегистрировано 2919 очагов, из них 228 не ликвидированы.

По предоставленной информации МЭБ три страны мира объявлены эндемичными по БТ: Испания по серотипу 1 признана эндемичной с 23 мая

2008 г., а по серотипу 8 признана с 16 марта 2009 г. Португалия признана эндемичной по двум серотипам БТ, по серотипу 4 - с 19 мая 2008 г. и по серотипу 1 - с 15 мая 2009 г. Словения объявлена эндемичной с 02 декабря 2015 г. по серотипу 4.

В России в период с 2008 по 2011 гг. вспышки БТ среди КРС обнаружены в Белгородской, Калужской, Курской, Липецкой, Ярославской областях и Ставропольском крае [4].

На сегодняшний день эпизоотическая ситуация по этому заболеванию остается напряженной, инфекция прогрессирует и распространяется, в том числе в Азиатском регионе. Так при проведении исследований в конце 1990-х годов в Казахстане [8] и в 2007-2008 гг. в Монголии [9] в сыворотках крови жвачных животных выявлены антитела к ВБТ. Также в 2013 г. в сыворотках крови яков в Кыргызской Республике выявлены антитела к ВБТ [7], что свидетельствует о возможном наличии природного очага инфекции на указанных территориях [2, 3, 5, 6].

Анализ мировой эпизоотической ситуации по БТ показывает, что в следствии вспышек болезни в мире за последние 15 лет пало и уничтожено огромное количество голов МРС и КРС, чем был нанесен огромный ущерб животноводческой отрасли и в целом экономике неблагоприятных стран. Эпизоотией данной болезни были охвачены страны практически всех континентов [3, 5].

1.6. Противоэпизоотические мероприятия при БТ

Меры борьбы с БТ основаны на знании особенностей эпизоотологии болезни, таких, как стационарность, сезонность, трансмиссивный путь передачи инфекции и существования множества серотипов возбудителя. В соответствии с особенностями эпизоотологии БТ радикальные мероприятия по борьбе с инфекцией сводятся к ликвидации вытла мотрецов и комаров в

местах их обитания, что, прежде всего, достигается мерами уничтожения зарослей, предупреждением наводнений и разливов в речных долинах, осушением болот и прочими мероприятиями. Данные мероприятия обязательны вблизи районов размещения животных, восприимчивых к БТ.

В неблагополучных по данной болезни странах мира мероприятия по профилактике и ликвидации БТ проводят по общей схеме: убивают больных и подозреваемых в заражении животных в первичном очаге; вакцинируют жвачных в угрожаемой зоне; уничтожают кровососущих насекомых-переносчиков в помещениях и в природе [3, 39]. В благополучных по БТ странах профилактические мероприятия ограничиваются запрещением ввоза животных из неблагополучных стран, карантинированием домашних и диких жвачных в местах ввоза. Исключением является только Австралия, где программа борьбы с БТ основана на вакцинации восприимчивых животных, даже при обнаружении носительства вируса у переносчиков [82].

При новой эпизоотии в ранее благополучной по БТ стране рекомендуется обязательная вакцинация всех овец по испанско-португальскому методу в два этапа: вакцинация в очагах инфекции и в угрожаемых зонах и массовая профилактическая вакцинация овец по всей стране [83].

В странах, где регистрировалась болезнь, стратегия борьбы основана на вакцинации овец, осуществлении клинического и серологического надзора. При этом перемещение животных из них допускается в те страны и зоны, в которых доказано отсутствие видов *Culicoides*, способных передавать ВБТ [84]. При вспышках БТ в средиземноморских государствах был наложен строгий запрет на международные передвижения восприимчивых животных из неблагополучных стран и зон.

Международная ситуация претерпела серьёзные изменения в 1998 г., когда по причине массовой эпизоотии БТ возникла необходимость создания новой стратегии борьбы с заболеванием в масштабах мира. Стандарты МЭБ

по БТ были пересмотрены, в связи с этим в Наземный кодекс была включена новая глава, посвященная надзору за БТ [85].

После массовой эпизоотии БТ в средиземноморских странах, Совет Евросоюза своей Директивой номером 2000/75/ЕС [86] предусматривает три уровня зон, по отношению к которым должны приниматься меры ограничения на перемещения: зона радиусом 20 км; защитная зона, окружающая первую, радиусом не менее 100 км от зараженного хозяйства; зона надзора минимальным радиусом 50 км от границ защитной.

Новая стратегия позволила значительно ограничить распространение вируса, в том числе и в тех странах, которые были затронуты несколькими серотипами вируса. БТ удалось ликвидировать в регионах, прилегающих к территориям, пораженным болезнью, то есть в тех, где вакцинация и контроль перемещений проводились в полном соответствии с новой стратегией [87].

Таким образом, анализ приведенных данных позволяет сделать вывод, что на современном этапе главными противоэпизоотическими мероприятиями при БТ является массовая вакцинация всех домашних жвачных и обращение к активному надзору для максимального ограничения зон на перемещения. Также, важны такие факторы, как оценка риска, раннее оповещение, готовность планов реагирования в чрезвычайных ситуациях, а также создание и поддержание резерва вакцины, что приносит большую выгоду и рентабельность для стран, неблагополучных по блутангу.

1.7. Средства специфической профилактики БТ и их эффективность

Первые попытки вакцинации против БТ были предприняты А.Theiler в 1906 г. [34]. Полученная автором вакцина из штамма живого вируса, измененного путем последовательных пассажей на овцах, в течение

длительного времени оставалась единственным профилактическим препаратом. Штамм Theiler, типированный как 4-й серотип ВБТ, использовали для вакцинации овец в течение 40 лет. Однако вакцина с применением данного штамма имела ряд существенных недостатков, главным из которых являлось его довольно высокая реактогенность и моновалентность, поэтому вакцина обладала узким спектром иммуногенности.

В 1940 г. Alexander G.I. предложил метод аттенуации ВБТ путем пассирования в РКЭ при пониженной температуре (32 °С). В результате исследований авторами были получены штаммы, утратившие свою вирулентность для восприимчивых животных. В последующем он изготовил живую поливакцину из 4-х штаммов вируса, включающую один штамм 12-го серотипа, два штамма 3-го серотипа и штамм Theiler 4-го серотипа [15]. Данная вакцина при введении животным в объеме 0,5-1,0 мл на 10-е сут вызывала формирование иммунитета продолжительностью в течение года. По аналогичному методу были созданы вакцины в зарубежье [16, 88, 89].

Василенко Н.З. и др. [27, 55], Howell P.G. и др. [90, 91] также использовали РКЭ для аттенуации ВБТ, однако из-за большого количества балластных белков эти препараты применения не нашли. В 1973 г. Василенко Н.З. и др. разработали живую вакцину против БТ, полученную аттенуацией вируса в культурах клеток ПЯ и эмбриона КРС [56].

В 1990-х годах в ЮАР была изготовлена живая аттенуированная вакцина из 14 различных серотипов вируса, выращенных в культуре клеток ПЯ и эмбрионов КРС, которую широко использовали для иммунизации восприимчивых животных [92]. Ее также применяли в ограниченной степени в США и некоторое время в странах ЕС, а также в Турции и Марокко [93]. Кроме того, в США выпускают моновалентные вакцины против 10, 11 и 17 серотипов, в Турции и Марокко - вакцину против 4 серотипа [94]. Помимо

вышеуказанных препаратов, разработанные одно- и поливалентные живые вакцины против БТ представлены в табл. 1.2 [95].

Таблица 1.2 – Перечень живых вакцин против БТ, разработанных в мире

Страна/год	Серотип	Штамм	История пассажа
ЮАР, 1958	ВБТ1	Biggarsberg/8012	50Е 3Р 4ВНК
ЮАР, 1958	ВБТ2	Vryheid/5036	50Е 3Р 4ВНК
Cyprus, 1944	ВБТ3	Cyprus/8231	45Е 2ВНК 3Р 5ВНК
ЮАР, ~1900	ВБТ4	Theiler/79043	60Е 3Ра 9ВНК
ЮАР, 1953	ВБТ5	Mossop/4868	50Е 2ВНК 3Ра 6ВНК
ЮАР, 1958	ВБТ6	Strathene/5011	60Е 3Ра 7ВНК
ЮАР, 1955	ВБТ7	Utrecht/1504	60Е 3Ра 4ВНК
ЮАР, 1937	ВБТ8	Camp/8438	50Е 3ВНК 10Ра 7ВНК
ЮАР, 1942	ВБТ9	Farm/2766	70Е 2ВНК pp 3ВНК 7Р
Portugal, 1956	ВБТ10	Portugal/2627	6ВНК
ЮАР, 1944	ВБТ11	Nelspoort/4575	Е82
ЮАР, 1941	ВБТ12	Estantia/75005	35Е 3Р 5ВНК
ЮАР, 1959	ВБТ13	Westlands/7238	55Е 3Р 4ВНК
ЮАР, 1959	ВБТ14	Kolwani/89/59	45Е 2ВНК 3Ра 4ВНК
ЮАР, 1976	ВБТ19	143/76	60Е 3Ра 4ВНК 29Е 3Р6 3ВНК
США	ВБТ10	Живой вирус	Нет данных
Турция	ВБТ4	Модифицированный	Нет данных
Морокко	ВБТ4	Аттенуированный	Нет данных
Калифорния, США	ВБТ10	Bluevac-10	Нет данных
	ВБТ11	Bluevac-11	
	ВБТ17	Bluevac-17	
Китай	ВБТ1	Живой аттенуированный	Адаптированы и пассированы в РКЭ
	ВБТ16		

Примечания

- 1 а – мелкобляшечный вариант;
- 2 ВНК – количество пассажей в культуре клеток ВНК-21;
- 3 Е – количество пассажей в развивающих куриных эмбрионах;
- 4 Р – количество больших бляшек;
- 5 р – количество мелких бляшек;
- 6 ЮАР – Южноафриканская республика.

Эти вакцины были признаны безопасными для муфлонов, снежных баранов, для овец породы Дорсете, а также для британских и австралийских овец мериносовых пород [95-98].

Преимуществами аттенуированных живых вакцин являются легкая воспроизводимость, экономичность, они при однократном введении индуцируют формирование прочного и длительного иммунитета. Однако, у живых вакцин имеются недостатки – они не поддерживают стратегию дифференциации инфицированных от вакцинированных животных [99]. Для аттенуации вакцинных штаммов вируса требуется длительный период с последующим тщательным изучением их биологических свойств. Недостаточностью аттенуированного вакцинного штамма является возможность реверсии и заболевания среди ослабленных животных. Также не исключена возможность реверсии вирулентности вакцинных штаммов в организме переносчиков.

Так Foster M. с соавт. установили факт реверсии вакцинного штамма в организме вектора *Culicoides varipensis*. Экспериментально доказано, что *Culicoides spp.* могут переносить аттенуированный вирус от вакцинированных овец к невакцинированным и вызвать у восприимчивых особей тяжелые формы болезни. Достаточно укуса одного мокреца, насосавшегося кровью вакцинированной овцы, чтобы вызвать заболевание у восприимчивого животного [17].

В связи с этим многие исследователи высказывали предположение о том, что с помощью живых вакцин вряд ли удастся добиться полной ликвидации заболевания, особенно в тех странах, где оно появилось впервые. По их мнению, в этих случаях для профилактики БТ более эффективными являются инактивированные вакцины [100].

В СССР первая безопасная высокоиммуногенная инактивированная вакцина против БТ была разработана во ВНИИВВиМ Сергеевым В.А., Ананьевой-Рященко Н.П. и Кошелевой Р.В. в 1980 г. [21, 22].

В Китае Li-Zhi Hua с соавт. разработали вакцину с использованием гидроксилamina для инактивации штаммов Y863F6 и WF13 вируса БТ, выращенных на культуре клеток ВНК-21 [101]. Данную вакцину успешно использовали против БТ овец в эпидемических областях провинции Хубэй.

В 1975 году Parker с соавт. разработали экспериментальную инактивированную вакцину против БТ из вируса 3-го и 4-го серотипов, выращенного в монослое клеток ВНК-21, инактивированного БПЛ в концентрации 0,2 % [102]. Введение такой вакцины животным в объеме 5 и 20 мл не вызывало побочных реакций и стимулировало образование ВНА на 8-10 сут. после вакцинации с увеличением их титра на 14 сут., которые сохранялись у овец в течение одного года [103].

Также в разные годы учеными были разработаны многие инактивированные вакцины против БТ. Так, В.И. Балышева и др., В.Сливко, Di Emidio с соавт. и Ramakrishan M.A. с соавт. разработали вакцины против различных серотипов ВБТ [23, 24, 25, 104, 105]. Все они продемонстрировали положительные результаты при иммунизации восприимчивых животных против данной болезни.

В настоящее время во всем мире [98] промышленный выпуск инактивированных вакцин против БТ осуществляется в компаниях стран Евросоюза, Китая, США, Италии и Индии (табл. 1.3).

Таблица 1.3 – Перечень инактивированных БТ вакцин, выпускаемых в мире

Страна	Серотип	Производители и характеристики	Ссылки
1	2	3	4
Евросоюз	ВБТ 2, 4, 9, 16	Жидкий, моно- или мультивалентная с адьювантом ISA. Коммерческая вакцина	[98]

Продолжение таблицы 1.3

1	2	3	4
	ВБТ 8	Инактивированная и с адъювантами ГОА и Сапонин (BTVPUR AlSap 8®)	[98]
Италия	ВБТ 2	Инактивированный БПЛ и с адъювантом ISA 206	[104, 106]
Италия	ВБТ 2, 4	Бивалентная инактивированная вакцина с адъювантом ISA 206	[107]
	ВБТ 16	Инактивированная вакцина с адъювантом ISA 206	[108]
Индия	ВБТ 1, 23	Бивалентная, инактивированная ДЭИ- формальдегидом, с адъювантом ISA50.	[98]
	ВБТ 1, 23	Инактивированный ДЭИ- формальдегидом, с адъювантом Span 80 и Tween® 80).	[98]
	ВБТ 18	Инактивированный гидроксиламином, с адъювантами ГОА и сапонин омбинированный	[105]
	ВБТ 1	Инактивированный ДЭИ, с добавлением сапонина	[109, 110]
	ВБТ 2	Инактивированный ДЭИ, с добавлением сапонина	[109]
	ВБТ 1, 23	Инактивированный БПЛ, с добавлением ISA50	[98]
Индия	поливалентная (ВБТ 1, 2, 15, 18, 23)	Инактивированная, поливалентная вакцина содержащая серотипы ВБТ 1, 2, 15, 18 и 23, с адъювантам Montanide ISA50	[98]
США	ВБТ 11, 17	Инактивированная БПЛ, с адъювантом ГОА	[111]
		Инактивированная вакцина	[112]
Китай	ВБТ 1, 16	Инактивированная вакцина	[113]

Из обобщённых данных табл. 1.3 видно, что специфическую профилактику БТ осуществляют с использованием инактивированных вирусов с различными адьювантами. Все перечисленные инактивированные вакцины имеют ряд преимуществ перед аттенуированными, связанные в первую очередь с безопасностью, высокой иммуногенностью препарата и широким видовым спектром вакцинируемых животных. На данный момент они остаются самыми эффективными и надёжными средствами специфической профилактики БТ во всем мире.

1.8. Производственные штаммы ВБТ для создания вакцин

В настоящее время установлено 27 серотипов ВБТ по всему миру, находящихся в разных географических регионах. Так, 13 серотипов (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22, и 24) были зарегистрированы в США [114 -116], 8 серотипов (1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, и 16) в Европе [115-117]. По литературным данным, в Азиатских регионах встречаются следующие серотипы: 1, 2, 3, 4, 7, 12, 15 и 16 [118-122].

Вирус каждого серотипа создаёт прочный и длительный иммунитет только против гомологичного типа и незначительный против гетерологичного. Степень выраженности иммунитета против гетерологичных типов различна. При одновременном инфицировании различными серотипами вируса и даже различными штаммами одного серотипа может происходить генетическая рекомбинация. Антигенный шифт является результатом реассортации сегментов генома при смешанном инфицировании, что необходимо учитывать при конструировании вакцин против того или иного серотипов ВБТ [118].

Для изготовления инактивированных вакцин рекомендуется использовать высокоиммуногенные штаммы с низкой вирулентностью. При некоторых заболеваниях основным условием успешного применения

инактивированной вакцины является использование такого штамма, антигенная структура которого хорошо соответствует вирусам, циркулирующим в данный период в природе [139].

Поэтому, для создания собственной вакцины необходимо в первую очередь учитывать то, что штаммы в составе инактивированных вакцин должны быть не только иммуногенными, но и эпидемически актуальными для применения на территории Казахстана, где на сегодня циркулируют ВБТ.

1.9. Субстраты для культивирования ВБТ

Массовое приготовление инактивированных вакцин лимитируется трудностью получения вирусного сырья или большого количества полноценного антигена. Поэтому проблема разработки технологии изготовления инактивированных вакцин не может плодотворно решаться без усовершенствования существующих и разработки новых методов культивирования, обеспечивающих получение вирусного материала с высоким титром [123, 124].

В 1940 г. Alexander с соавторами впервые сообщили о способности ВБТ размножаться в куриных эмбрионах, которые погибали при заражении различными методами. Наиболее часто заражают 6-8-дневных эмбрионов в желточный мешок или 9-11-дневных эмбрионов в вену. В 1947 г. Alexander и Naig установили, что наибольшее накопление вируса происходит при инкубации заражённого куриного эмбриона при 33,5 °С, в период от 36 до 72 ч, при этом титр вируса достигает $10^{5,60}$ - $10^{8,0}$ ELD₅₀/мл в зависимости от штамма вируса. Микроскопически у таких эмбрионов отмечаются изменения в клетках мышц, печени, почек, мозга, кровеносных сосудов [15, 34, 125, 126]. Относительная лёгкость и постоянство этого процесса позволили получить живые вакцины, широко применяющиеся во многих странах.

К ВБТ оказались чувствительны также белые мыши при интрацеребральном заражении. У взрослых мышей инфекция протекает бессимптомно, и вирус накапливается в мозгу в невысоких титрах. При заражении мышат до 10-13 дневного возраста наступает 100 % гибель, и вирус накапливается в мозгу в титрах $10^{6,0}$ - $10^{8,0}$ MLD₅₀/мл. Наиболее чувствительны мышата в возрасте 1-4 дней, их гибель наступает через 24-36 ч после заражения. В мозгу накопление вируса достигает титра 10^6 - $10^{8,0}$ MLD₅₀/мл, его и используют для получения антигена, необходимого для обнаружения антител в сыворотках переболевших животных с помощью РСК. Полевые штаммы удаётся выделять на 1-4-дневных мышатах после 2-4 слепых пассажей [127].

Штаммы ВБТ, адаптированные к куриным эмбрионам или мышам, хорошо размножаются в мозгу новорождённых золотистых хомячков, и их можно использовать, как и мышат. Собаки, кошки, кролики, морские свинки, хорьки к ВБТ не чувствительны [92].

В производстве вирусных препаратов широкое применение нашли первичные культуры и линии диплоидных клеток. Для большинства вакцин, применяемых в ветеринарной практике, вирус выращивают в культурах постоянных клеточных линий, использование которых особенно целесообразно в плане крупномасштабного суспензионного культивирования.

О цитопатическом действии ВБТ на культуру клеток почки овцы впервые сообщили Mak Kercher, Naig и Alexander в 1965 г. Fernandes (1959) сообщил [128], что культуры клеток почки ягнёнка достаточно чувствительны для выделения вируса из крови больных овец. Была установлена чувствительность к этому вирусу таких перевиваемых линий клеток, как HeLa, амнион человека, почки овцы и др. Но наиболее чувствительными из них, по данным Tiní и соавт., оказались клетки ВНК-21 и EL [90, 91].

В настоящее время наиболее широко используют для выделения и размножения ВБТ первичные культуры клеток ПЯ и эмбриона крупного рогатого скота, а также ВНК-21 [129-131].

Необходимо отметить, что проблема изготовления инактивированной вакцины против того или иного вирусного заболевания зависит не только от типовых вариантных и штаммовых особенностей вируса. Она связана с успешным решением таких основных вопросов, как правильный подбор инактивирующего средства, в качестве которого могут быть использованы различные физические и химические факторы. Некоторые аспекты инактивации вирусов под воздействием физических и химических факторов можно резюмировать следующим образом.

1.10. Инактиванты и способы инактивации ВБТ в вакцинном деле

Инактивированные вакцины готовят путем воздействия на вирусы физических и химических факторов таких как: температура, ультрафиолетовые и гамма лучи, гидоксиламин, бета-пропиолактон (БПЛ), димерэтиленимин (ДЭИ), формалин и другие [132, 133, 139].

Используемые методы инактивации имеют свои достоинства и недостатки и при выборе того или иного способа должны учитываться все факторы [132, 133]. Следует отметить, что инактивация должна быть не только эффективной, но и максимально щадящей (селективной). Иными словами, сопутствующие изменения в структуре вирусных частиц и их компонентов должны быть минимальными.

Из химических соединений наиболее часто используют два типа инактивантов: ретикулирующие (разрыхляющие) и алкилирующие (разрушающие) средства. К ретикулирующим агентам относятся альдегиды, в том числе формальдегид, глютаральдегид и глицидальдегид, из которых

наиболее часто используют формальдегид в производстве вакцин как ветеринарного, так и медицинского назначения [123, 134].

Формальдегид инактивирует вирусы благодаря высокой реакционной способности в отношении белков и нуклеиновых кислот. При взаимодействии с нуклеиновой кислотой формалин вступает в реакцию с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований, а также нарушает водородные связи, обеспечивающие вторичную структуру компонента вируса. Однако формальдегид на определённых этапах воздействия разрушает источник инфекционности вирусов – нуклеиновую кислоту – и сохраняет при этом его антигенный фонд, белковую оболочку [133, 135].

Следовательно, скорость инаktivации нуклеиновой кислоты будет зависеть от скорости проникновения вещества через белковую оболочку вирусной частицы. Поэтому при реакции формальдегида с вирусом скорость инаktivации снижается с увеличением длительности обработки [136-138].

Исследования по инаktivации ВБТ проведённые в 1970-х годах в НИСХИ показали, что формальдегид в конечной концентрации 0,1 % и 0,05 % при температуре 10° С инаktivирует ВБТ в течение 4 и 6 сут соответственно. Повышение температуры до 25° С при указанных концентрациях укорачивает продолжительность инаktivации до 3 и 4 сут. соответственно. При температуре 37°С и концентрации 0,1 % инаktivация вируса отмечена через 24 ч [139].

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы показывает, что наряду с формальдегидом его производные являются хорошими инаktivантами для подавления инфекционной активности вирусов [140-143].

В последние годы исследователями широко используются бета-пропиолактон (БПЛ), азиридины, и особенно этиленимин и его производные [144]. Этиленимин – насыщенное гетероциклическое соединение, впервые было синтезировано из бромэтиламина в 1988 году. Димерэтиленимин (ДЭИ) является производным этиленимина промышленного изготовления,

производство которого налажено на Покровском заводе биопрепаратов РФ. Безводный ДЭИ обладает высокой стабильностью при хранении. По данным некоторых авторов инактивация ВБТ ДЭИ (0,04-0,06 %; в течение 3-5 дней) позволила получить безопасный иммуногенный препарат. Повышение концентрации ДЭИ и продолжительности обработки вируса в 2-3 раза заметно не снижала его иммуногенности и гарантировала получение безопасной вакцины, что свидетельствует о мягком инактивирующем действии ДЭИ на ВБТ [21, 22].

Для инактивации вирусов чаще применяют ДЭИ, который отличается значительно меньшей токсичностью по сравнению с другими азиридинами [132]. Преимущества ДЭИ по сравнению с БПЛ доказаны на примере вирусов ящура [145], везикулярной болезни свиней [146], гриппа лошадей [147], лейкоза КРС [148], инфекционного бронхита кур [149] и гриппа птиц [150].

Одним из проверенных и достаточно надёжных химических агентов, используемых для инактивации вирусов, является БПЛ. Он представляет собой высокоактивный алкилирующий агент, нестойкий в водных растворах и легко гидрализующийся с образованием безвредных веществ: гидроакриловой и бета-оксипропионовой кислот [132, 133].

Инактивация вирусов БПЛ зависит от концентрации, температуры и содержания белка в вирусной суспензии. Действие БПЛ на вирусы детально изучено многими исследователями, которые полагают, что инактивирующий эффект этого реагента обусловлен реакцией с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот. При этом протеиновая оболочка как носитель иммуногенной и антигенной активности вирусов остаётся неповреждённой. Для инактивации вирусов обычно используют его в концентрации от 0,1 до 1 %, обработку ведут при температурах (4 – 37) °С [132, 135].

Экспериментальные исследования Хлыбовой и др. по инактивации ВБТ раствором БПЛ показали, что концентрация 0,2 % при 4 °С инактивирует

вирус в течение 24 ч, повышение концентрации до 0,4 % приводит к потере инфекционности за 8 ч. При проведении аналогичных исследований при температуре 37 °С было установлено, что при 0,2 % инактивация происходит за 4 ч, при 0,4 % за 1 ч [139].

В настоящее время с использованием БПЛ изготовлены авирулентные, безвредные вакцины и диагностические препараты против клещевого энцефалита, ящура, полиомиелита, энцефаломиелита птиц, болезни Ньюкасла, чумы свиней и болезни Ауески [144, 151]. Имеются сообщения, свидетельствующие о том, что так называемые «бета-пропиолактон» инактивированные вакцины обладают более выраженной иммуногенностью по сравнению с вакцинами, приготовленными с помощью формалина или других веществ.

В заключение следует отметить, что в настоящее время проведено много исследований, подтверждающих высокую эффективность методов инактивации вирусов, в том числе ВБТ. Анализ литературных данных показал, что получение инактивированных вакцин против ВБТ во всем мире осуществляется с использованием формалина, ДЭИ и БПЛ. Однако, по результатам ранее проведенных исследований ВБТ инактивированный формалином и ДЭИ [19], в процессе инактивации быстро утрачивают свою иммуногенность. Поэтому, БПЛ остается основным инактивирующим средством при изготовлении вакцины против БТ и в связи с этим основная цель нашего исследования является совершенствование режима инактивации ВБТ бета-пропиолактоном.

1.11. Адьюванты в составе противовирусных вакцин

Задачей вакцинации является создание напряженного и длительного иммунитета путем максимального вовлечения в иммуногенез защитных механизмов организма, что во многом связано с выбором и использованием

неспецифических стимуляторов иммуногенеза – адъювантов. Поскольку многие вирусные вакцины вызывают слабые иммунные реакции, стали использовать адъюванты, добавление которых дало возможность в различной степени возместить этот недостаток [152].

По мнению Учителя И.Я., адъювантами могут быть вещества различной природы, оказывающие разный местный эффект: создающие "депо", вызывающие воспалительную реакцию и др. [153]. Адъюванты участвуют в процессах, происходящих на начальных этапах антителогенеза. Введение адъювантов усиливает клеточную пролиферацию и дифференцировку клеток, активируют их метаболизм, но, прежде всего адъюванты изменяют функциональную активность клеток моноцитарной фагоцитирующей системы. Последнее имеет наиболее существенное значение для интенсивности иммуногенеза и его длительности.

В качестве адъювантов наиболее широкое распространение в медицине и ветеринарии получили соли алюминия (гидроокись алюминия, фосфат алюминия, алюмокалиевые квасцы). В последние годы среди них гель гидрата окиси алюминия широко используется и применяется при изготовлении инактивированных вакцин. Антиген адсорбируется на него посредством ионного взаимодействия, поэтому вакцины, приготовленные с такими адъювантами, принято называть адсорбированными или сорбированными. Доказано, что они оказались эффективными и безопасными, благодаря чему им отдаётся предпочтение в медицинской практике. Алюминиевые соли стимулируют синтез антител в лимфоузлах и вызывают скопление плазматических клеток в местах образования поствакцинальных гранулём. На сегодняшний день в медицинской и ветеринарной практике большинство противовирусных вакцин содержит гидрат окиси алюминия [154].

Из веществ органической природы в качестве адъюванта часто используют сапонин [155, 156]. Известно, что сапонины, относящиеся к

большой группе гликозидов растительного происхождения, имеют сложное химическое строение [156] и обладают различными токсическими, гемолитическими и адьювантными свойствами [157].

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что поиск наиболее эффективных адьювантов остается одним из актуальных вопросов при производстве эффективных инактивированных вакцин.

В последнее время в практику вошел новый тип адьюванта, приготовленный на основе минеральных и неминеральных масел и их смесей. При использовании такого адьюванта предварительно растворенный или суспендированный в воде антиген очень тонко диспергируют в масле, в результате чего получают эмульсию типа «вода в масле», то есть капельки воды с антигеном находятся в масляной фазе [132].

Согласно литературным данным, биопрепараты с масляными адьювантами имеют более высокую иммуногенность, чем сорбированные вакцины. Вакцины с масляными адьювантами отличаются высокой иммуногенной активностью, но их применение сдерживается вследствие индуцирования серьезных местных реакций, образования абсцессов и других патологий. Менее иммуногенные, по сравнению с масляными, сорбированные вакцины, содержащие в качестве адсорбентов-адьювантов гели гидрата окиси алюминия, фосфата алюминия, фосфата кальция имеют меньшую токсичность для животных, однако также могут особенно при подкожном введении вызывать образование стерильных абсцессов и длительно персистирующих узелков.

Экспериментальные исследования и практические наблюдения многих авторов свидетельствуют о высокой активности эмульсионных противоящурных вакцин типа «вода-масло», которые вызывают у привитых животных напряженный и продолжительный иммунитет по сравнению с другими формами вакцин [158].

У различных авторов нет единого мнения и на механизм действия адьювантов, и они по-разному освещают этот вопрос. Вместе с тем, суммируя данные литературы по механизму действия адьювантов, можно сделать следующее заключение: адьюванты в составе инактивированных вакцин обеспечивают корпускулирование и депонирование антигена; способствуют развитию воспалительной реакции на месте введения со стимуляцией фагоцитарной активности и плазмоцитарной реакции; обеспечивают митогенные действия на лимфоциты с активацией макрофагов и выделением медиаторов, влияющих на клетки иммунной системы [158-161].

В настоящее время в составе инактивированных вакцин против БТ применяются в основном такие адьюванты, как гидроокись алюминия, сапонин, Montanide™ ISA-206 и ISA-50 [104-110]. Названные препараты обладают безопасностью и иммуногенны для овец и КРС.

В соответствии с вышеизложенным, следует отметить, что технология изготовления инактивированных вакцин против вирусных заболеваний зависит, главным образом, от правильного выбора производственного штамма, возможности получения высокоактивного вируссодержащего материала, разработки наиболее эффективного режима инактивации, а также удачного подбора адьювантов. Все эти факторы целиком и полностью определяют успех проделанной работы.

1.12. Заключение по обзору литературы

БТ распространен на юге, востоке, северо-востоке Африки, где он является стационарной болезнью. За последние 40 лет болезнь широко распространилась за пределами Африканского континента и зарегистрирована в Европейских и Азиатских странах. В Центральной Азии БТ официально не регистрируется, однако неблагополучие в соседних

государствах (Россия, Китай) делает реальной угрозой проникновения болезни в Казахстан.

Для предотвращения дальнейшего распространения инфекции одним из наиболее важных и сложных вопросов в системе противоэпизоотических мероприятий при БТ является специфическая профилактика. Применение моно- или поливалентных вакцин, содержащих инактивированный вирус, является самым эффективным методом борьбы с этим заболеванием в очагах и эндемичных регионах. Так как при использовании живых вакцин против БТ имеются риски, связанные с тератогенностью, реверсией вирулентности и генетического ассортимента сегментов генов. Таким образом, инактивированные вакцины считаются более безопасными и используются успешно в европейских странах, чтобы контролировать вспышки и уменьшить циркуляцию вируса [162, 163].

Проблема приготовления инактивированной вакцины связана с решением таких вопросов как, выбор штамма вируса с широким спектром антигенной активности, а также изыскание производственного метода культивирования вируса, обеспечивающего получение достаточного количества материала с высокой биологической активностью. Правильный подбор инактивирующего средства и разработка режима инаktivации, способствующего быстрому разрушению вирулентности возбудителя с максимальным сохранением его антигенности и иммуногенных свойств.

Для культивирования ВБТ широко применяются в основном перевиваемые клеточные линии. Исследования последних лет подтвердили эффективность использования перевиваемых клеточных линий в производстве противовирусных вакцин [130]. Так, ВБТ успешно культивируется в перевиваемых культурах клеток ПС, Vero, ВНК-21 и EL-4 др. [130, 131, 164]. Также хорошо изучены стационарные и роллерные способы культивирования ВБТ в культуре клеток. Однако данные способы являются малопродуктивными, трудоемкими и неэкономичными при

производстве противовирусных вакцин. Наиболее перспективным в области крупномасштабной наработки вирусного сырья для приготовления вакцин является суспензионный способ выращивания клеток и вирусов. Он имеет ряд важных преимуществ, основными из которых являются: возможность быстрого масштабирования, культивирование большого количества клеток и вирусов в одном ферментере с высокой плотностью популяции; равномерные условия для клеток и вирусов по всему объему выращивания; эффективный контроль и регулировка условий культивирования, высокая экономичность метода и др. [165-167]. Несмотря на перспективность суспензионного метода выращивания клеток и вирусов, до сих пор производство ветеринарных вирусных вакцин (кроме вакцин противоящурной и антирабической) основано на использовании клеток, культивируемых в условиях стационарного или роллерного монослоя.

Анализ литературных данных показал, что получение инактивированных вакцин против ВБТ во всем мире осуществляется с использованием формалина, ДЭИ и БПЛ. Однако по результатам ранее проведенных исследований ВБТ инактивированный формалином и ДЭИ [19], в процессе инактивации быстро утрачивают свою иммуногенность. Поэтому БПЛ остается основным инактивирующим средством при изготовлении вакцины против БТ и в связи с этим основная цель нашего исследования является совершенствование режима инактивации ВБТ БПЛ.

Правильный выбор адъюванта является важной задачей в разработке эффективных вакцин. В настоящее время в составе инактивированных вакцин против БТ применяются в основном такие адъюванты, как ГОА, сапонин, Montanide™ ISA-206 и ISA-50. Названные препараты обладают безопасностью и иммуногенны для овец и КРС. Вопрос выбора оптимального адъюванта решался посредством французской компании Serris, которая из широкой линейки своей продукции для разработки нашей вакцины в качестве наиболее оптимального адъюванта рекомендовала

Montanide™ ISA-71VG. Следует отметить, что данный адъювант впервые использовался в составе вакцины против БТ, поэтому было важно оценить физические характеристики и иммунобиологические параметры этой вакцины, в том числе в процессе ее длительного режимного хранения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и оборудование

Штаммы вируса

В процессе проведения экспериментальных исследований были использованы штаммы ВБТ: "Хуросон-07/04" серотип 4 (ВБТ-4) и "RT/RIBSP-07/16" серотип 16 (ВБТ-16), выделенные от МРС на территории Республики Таджикистан в 2007 году с биологической активностью 7,00 и 6,75 lg ТЦД₅₀/мл, соответственно [122].

Культуры клеток

В опытах использовали перевиваемые клеточные линии почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), почки африканской зеленой мартышки (VERO) и лимфомы индуцированной диметилбензантраценом линии мышей M57BL/6N (EL-4).

Животные

Для определения авирулентности, безвредности, иммуногенности экспериментальных вакцин против ВБТ использовали овец тонкорунной казахской породы в возрасте 6-12 мес, коз местной породы в возрасте 7-9 мес с живой массой 15-20 кг и КРС казахской местной аборигенной породы в возрасте 6-12 мес с живой массой 110-150 кг., доставленных из хозяйств республики, благополучных по острым инфекционным заболеваниям и серонегативных к ВБТ. А также для определения полноты инактивации ВБТ и для определения авирулентности использовали белых мышей 2-3 дневного возраста.

Животных до проведения экспериментов выдерживали на карантине в течение 2-х недель с проведением термометрии, клинического осмотра и

исследованием сывороток крови на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА). Содержание животных проводили в соответствии с "Инструкцией по содержанию подопытных животных и ветеринарно-санитарным правилам в экспериментально-биологических изоляторах" инв. №1069 [168]. Кормление животных проводили в соответствии с нормами и требованиями, предусмотренными для различных видов животных [169].

Питательные среды

При работе с вышеперечисленными культурами клеток в качестве ростовых и поддерживающих использовали полусинтетические среды для пристеночного (ПСП) и суспензионного (ПСС) культивирования клеток в различных модификациях, минимальную среду Игла (ИГЛА-МЕМ), Игла в модификации Дюльбекко (ДМЕМ) и полусинтетическую среду для культивирования клеток VERO, производства НИИПББ. Перечень и объемы приготовленных сред указаны в табл. 2.1 и показаны на рис. 2.1. и 2.2.

Таблица 2.1 - Прописи питательных сред, используемых в экспериментах

№ п/п	Аминокислоты	Питательные среды и их объемы				
		ПСП 100 л	ПСС 20 л	ИГЛА- МЕМ 20 л	ДМЕМ 20 л	VERO 100 л
1	2	3	4	5	6	7
1	Глицин	-	-	-	0,6	-
2	Аргинин	15,7	6,28	2,52	1,68	24,0
3	Валин	6,9	1,38	0,92	1,88	5,95
4	Гистидин	4,6	0,92	0,76	0,84	3,2
5	Изолейцин	7,8	1,56	1,04	2,10	5,2
6	Лейцин	7,8	1,56	1,04	2,10	5,5
7	Лизин	8,7	1,74	1,44	2,92	6,4

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6	7
8	Метионин	2,2	1,0	0,3	0,6	4,3
9	Серин	3,7	0,74	-	0,84	4,65
10	Треонин	7,2	1,44	0,96	1,9	5,9
11	Тирозин	5,4	1,08	0,72	2,0759	4,5
12	Триптофан	1,5	0,3	0,2	0,32	1,5
13	Фенилаланин	4,8	0,96	0,64	1,32	3,15
14	Цистеин	3,6	0,72	0,48	1,252	3,4
15	Глутамин	58,4	-	-	-	-
Витамины						
1	Тиамин	0,3	0,06	0,02	0,08	0,1
2	Рибофлавин	0,03	0,006	0,002	0,008	0,01
3	Пиридоксин	0,3	0,06	0,02	-	0,1
4	Мезойнозит	0,6	0,12	0,04	0,144	0,2
5	Пантатенат	0,3	0,06	0,02	0,08	0,1
6	Никотиномид	0,3	0,06	0,02	0,08	0,1
7	Фолевая к-та	0,3	0,06	0,02	0,08	0,1
8	Халин-хлорид	0,3	0,06	0,02	0,08	0,1
9	Глюкоза	200,0	109,8	20,0	90,0	475,0
Соли						
1	NaCl	760,0	152,0	136,0	128,0	680,0
2	KCl	40,0	8,0	8,0	8,0	38,0
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	13,0	2,6	4,0	1,953	19,0
4	KH ₂ PO ₄	6,0	1,2	-	-	3,0
5	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	12,0	2,4	-	-	13,0
6	CaCl ₂ ·6H ₂ O	28,0	5,6	4,0	8,0	24,0
7	NaHCO ₃	105,0	21,0	40,0	74,0	162,5
8	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	-	3,0	2,6	0
9	Нитрат железа	-	-	-	0,002	0



Рис. 2.1. Питательные среды ПСП, VERO и ПСС, разработанные в НИИПББ



Рис. 2.2. Среды ИГЛА-МЕМ и ДМЕМ

Культуры клеток, питательные среды и их компоненты получали из лаборатории "Клеточная биотехнология" НИИПББ.

Реактивы, растворы и сыворотки:

- эмбриональная сыворотка крови КРС фирмы «Biolot» Россия;

- нативная сыворотка крови КРС;
- 6% раствор глутамина;
- 7,5% раствор бикарбоната натрия;
- 0,25% раствор трипсина;
- 0,02% раствор версена;
- мясо-пептонный бульон (МПБ);
- мясо-пептонный агар (МПА);
- жидкая и твердая среда Сабуро;
- среда Тароцци;
- спирт этиловый (ГОСТ 18300-87);
- бензилпенициллина натриевая соль (1000000 ЕД);
- стрептомицина сульфат (0,5 г);
- нистатин порошковый (500 тыс. ЕД) «Sigma» (США);
- физиологический раствор (рН-7,2);
- 98%-ный водный раствор БПЛ (Польша);
- масляный адъювант Montanide™ ISA 71VG «Seppic» (Франция);
- гель ГОА «Sigma» (США);
- сапонин «Sigma» (США);
- конкурентный ИФА набор для обнаружения анти-VP7 антител «ID VET» (Франция);

Оборудование и прочие материалы:

- шкаф биологической безопасности ESCO II (Турция);
- CO₂- инкубатор Nuve (Турция);
- биореактор БИОК-022с (Россия);
- Ферментер для выращивания культуры клеток и микроорганизмов Biotron (Южная Корея)
- Сухожаровый шкаф Nuve (Турция);
- холодильники бытовые (2-6°C) Nord, Бирюса (Россия);
- центрифуга Effendorf (Китай);

- низкотемпературные холодильники (от -20 до -80 °С) PLATINUM 500 V (Италия), Frezeer (Китай);
- водяная баня ЕН 4.2 (Германия);
- дистиллятор АДЭ-50 (Россия);
- стерилизатор паровой DGM-80 (Швейцария/Китай)
- гомогенизатор T25 basic ULTRA-TURRAX, ИКА (Германия);
- рН-метр С830 (Бельгия);
- вискозиметр капиллярный стеклянный ВПЖ-2 (Россия);
- термостаты Binder (Германия);
- 48 луночные культуральные планшеты (Costar®, США);
- шприцы полуавтоматические, объемом 1 мл;
- пипетки дозаторы с переменным объемом (5-200 мкл).
- Вакутайнеры с иглой и иглодержателем для сыворотки и цельной крови.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Сбор полевых материалов от сельскохозяйственных животных

Для вирусологических и молекулярно-биологических исследований у сельскохозяйственных животных (КРС и МРС) отбирали молоко, сыворотки и цельную кровь в соответствии с руководством МЭБ 2007 года. Кровь брали из яремной вены с использованием вакутайнеров (Vacutainer® - BD Franklin Lakes, США), прокалывая стерильной иглой под углом 60⁰ по направлению к голове, и отстаивали до получения сыворотки. Сыворотку замораживали и хранили при температуре минус 20 °С. Биологический материал помещали в криопробирки с навинчивающейся полипропиленовой крышкой и снабжали этикетками, устойчивыми к жидкому азоту.

2.2.2. Подготовка проб для исследований

Поступивший в лабораторию биоматериал для исследований подвергался предварительной обработке согласно стандартным операционным процедурам: СОП № 591 «Обработка и аликвотирование поступившего в лабораторию материала животного происхождения», СОП № 590 «Подготовка крови животных для проведения серологических анализов», СОП № 97 «План мероприятий по предотвращению контактов с опасными материалами». Стандартные операционные процедуры предусматривают порядок подготовки различных типов материалов в лаборатории для анализа, дают конкретные указания по обработке проб и мерах безопасности.

2.2.3. Суспензионное культивирование клеток

Эксперименты по суспензионному культивированию клеток проводили в газовихревом биореакторе БИОК-022с. В опытах по культивированию клеток также были использованы спиннеры "Techne" с культуральными сосудами различного объема (50 мл, 250 мл, 500 мл, 1,5 дм³).

Криоконсервированные в жидком азоте суспензионные культуры после оттаивания, ресуспендировали свежей питательной средой, подсчитывали количество клеток в камере Горяева, в зависимости от количества живых клеток готовили суспензию с концентрацией от 5×10^5 до $1,0 \times 10^6$ кл/мл и вносили в культуральные сосуды, реакторы и ферментеры и культивировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании.

Для суспензионного культивирования клеток важным условием являлось перемешивание, которое должно быть непрерывным и достаточно интенсивным, чтобы поддерживать клетки во взвешенном состоянии, препятствующее их осаждению и прикреплению к стенкам сосуда и в то же время не вызывать вспенивания и механического повреждения клеток [170-172].

В газовихревом биореакторе перемешивание суспензионных культур проводили со скоростью 1000 об/мин. Скорость перемешивания зависит от объема заполнения сосуда, малые объемы культуры требуют невысокой скорости, тогда как при больших объемах ее необходимо увеличить.

Максимальный рост клеток в суспензии наблюдали при поддержании pH среды в пределах 7,0-7,2. При культивировании клеток ВНК-21 в суспензионных условиях использовали среду Игла с двукратной концентрацией аминокислот и витаминов. А при культивировании клеток EL-4 использовали среду RPMI-1640. Оптимальная концентрация кислорода для различных клеточных культур находится в пределах от 9 до 17% или 293 мм рт. столба. При концентрации кислорода выше 20% происходит снижение клеточного роста. Повышение концентрации кислорода также приводило к повышению pH и токсично воздействовало на клеточный метаболизм.

2.2.4. Культивирование ВБТ суспензионным методом

В опытах использовали 4 и 16 серотипы ВБТ с биологической активностью $5,50 \pm 0,12$ и $5,75 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/мл, соответственно. В качестве системы культивирования использовали перевиваемые линии клеток ВНК-21 и EL-4. Данные линии клеток культивировали во взвешенном состоянии в лабораторных биореактерах БИОК-022с 5-литровой емкости при скорости вращения мешалки 800-1000 об/мин. Для линии клеток EL-4 в среду RPMI-1640, добавляли 600 мг/л глутамина, 5% сыворотки КРС, pH среды колебалось в пределах 6,8-7,4. Остальные параметры культивирования ВБТ проводили согласно ранее опубликованной работе [19, 173]. Инфицирование клеток проводили в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл, при температуре инкубирования ($37,0 \pm 0,5$) °С с ежедневным подсчетом количества клеток в камере Горяева.

2.2.5. Определение инфекционной активности ВБТ

Биологическую активность вируса определяли методом титрований согласно методике [20] в культуре клеток Vero, выращенной в культуральном микропланшете при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С. За инфицированной культурой клеток наблюдали в течение 8-10 сут. Титр вируса рассчитывали по методу L. Reed и H. Muench, выражали в \lg ТЦД₅₀/мл [174].

2.2.6. Инактивация вируса

Инактивацию вируса проводили в закрытых стеклянных колбах. В качестве инактиванта использовали БПЛ очищенный 98 %. Для инактивации вируса готовили 8 % рабочий водный раствор. Для инактивации ВБТ в ВСС добавляли БПЛ в финальных концентрациях 0,05 %, 0,1 % и 0,2 %. Вирус инаktivировали при температурах 6, 22 и 37 °С. Значение рН реакционной среды устанавливали в диапазонах 6,5-6,9; 7,0-7,4 и 7,5-8,0.

Необходимый рН реакционной среды в течение всего периода инактивации устанавливали с помощью 8,5 % раствора аммиака и 30% раствора уксусной кислоты. Колбы с реакционной смесью периодически перемешивали 3-4 раз в сут. по 3-5 мин. с помощью магнитной мешалки. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, прекращали действие инактиванта добавлением раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации 0,25 % и помещали в холодильник при температуре 4-6 °С. Инфекционная активность вируса определялась по общепринятой методике с учётом результатов титрования по методу L. Reed и H. Muench и выражением в \lg ТЦД₅₀/мл.

Оценку сохранности антигенной активности ВБТ проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА).

Константу скорости инактивации (K) вычисляли по формуле (2.1) и определяли кинетику инактивации вируса [175]:

$$K = \frac{\lg G_0 - \lg C_t}{T} \times 2,3 \quad (2.1)$$

где: $\lg G_0$ - исходный титр вируса;

$\lg C_t$ - титр вируса через определенный промежуток времени;

T - время инаktivации вируса;

2,3 - коэффициент перевода натуральных логарифмов в десятичные.

Константу скорости инаktivации (K) выражали в час (потеря инфекционной активности вируса за единицу времени, т.е. за час).

2.2.7. Контроль авирулентности инаktivированной вирусной суспензии

Полноту инаktivации ВБТ определяли путем 3-х кратного пассирования в культуре клеток Vero. С этой целью использовали пробирки с полным монослоем клеток. В стерильные пробирки вносили по 2 мл инаktivированного вируса каждой серии и 18 мл питательной среды Игла. Содержимое пробирки перемешивали и вносили в 6-луночный планшет с монослоем 1-2 сут. культуры клеток Vero по 2 мл в каждую лунку. Культуру клеток выдерживали при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C в течении 30 мин. Затем монослой двукратно отмывали средой ПСП (по 2 мл). После этого в пробирки заливали по 2 мл питательной среды и инкубировали в течение 6 сут. при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C. Питательную среду меняли через 1 сут. после заражения. Для проведения следующего пассажа испытуемую культуру клеток замораживали при температуре минус 40 °C, оттаивали при комнатной температуре и проводили второй пассаж путем заражения суспензией первого пассажа культуру клеток Vero. Инкубировали испытуемую культуру в течение 6 сут. при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C. Третий пассаж проводили аналогично. Полноту инаktivации вируса оценивали по наличию или отсутствию ЦПД вируса в культуре на третьем пассаже.

Инактивированную суспензию считали авирулентной, если инактивированная вирусная суспензия после третьего пассажа не вызывала деструктивных изменений в монослое культуры клеток.

Авирулентность суспензии дополнительно контролировали на мышатах сосунах. Для этого 5 мышатам интрацеребрально вводили по 0,02 мл инактивированной суспензии вируса. Инактивированную суспензию считали авирулентной, если в течение 7 сут. после введения у мышат не отмечали клинических признаков заболевания, а также гибели.

2.2.8. Составление эмульгированной инактивированной бивалентной вакцины

Для составления бивалентной вакцины, инактивированный ВБТ4 и ВБТ16 серотипа объединяли в равных антигенных нагрузках, затем вакцину готовили путем объединения масляного адъюванта Montanide ISA-71VG и инактивированного антигена ВБТ в весовом соотношении 70:30, путем тщательного перемешивания при помощи лабораторного эмульсора (3000 об/мин в течение 7-10 мин) до получения эмульсии. Далее производили расфасовку при помощи дозирующего устройства в стерильные флаконы. Флаконы закрывали резиновыми пробками и закатывали алюминиевыми колпачками.

2.2.9. Контроль качества инактивированной вакцины

2.2.9.1. Определение стерильности

Стерильность полученных препаратов проверяли путем посева в пробирки с МПБ, МПА, Сабуро (жидкая и твердая) и Тароции в соответствии с ГОСТ 28085–89. Посевы выдержали в термостате при 37 °С в течение 15 сут. Заключение о стерильности вакцин давали при отсутствии роста микрофлоры в вышеуказанных питательных средах.

2.2.9.2. Контроль стабильности эмульсии

Стабильность эмульсии приготовленных инактивированных вакцин контролировали согласно инструкции компании «Serpic» (Франция) при помощи экспресс методов центрифугирования и термостатирования, описанного ранее [150, 151, 176].

Определение стабильности эмульсии методом центрифугирования.

Из трех флаконов с вакциной, после интенсивного встряхивания, отбирали по 10 см³ эмульсии и переносили ее в три стеклянные центрифужные пробирки. Пробирки с эмульсией центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин, после чего измеряли линейкой высоту столба прозрачной фракции в верхней части пробирки.

Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в каждой из трех пробирок в процессе визуального контроля не обнаружено никаких изменений содержимого, или высота столба прозрачной фракции, сформировавшейся в верхней части пробирки, не превышала 10 % от общей величины столба эмульсии. Не допускается появление после центрифугирования прозрачной фракции на дне пробирки или полного расслоения эмульсии.

Определение стабильности эмульсии методом термостатирования

Из трех флаконов с вакциной после интенсивного встряхивания отбирали по 5 см³ эмульсии в стеклянные пробирки, закрывали резиновыми пробками, и помещали в термостат с температурой нагрева $37,0 \pm 0,5$ °С. Срок наблюдения составлял 14 суток.

Эмульсию считали стабильной, если в течение всего срока наблюдения в каждой пробирке в процессе визуального контроля не обнаруживалось прозрачной водной фракции на дне пробирки или полного расслоения эмульсии. В процессе испытаний допускается появление прозрачной или желтоватой масляной фракции в верхней части пробирки, что легко устраняется встряхиванием и не является признаком расслоения. Эмульсию

вакцины считали стабильной, если в пробирке при визуальном просмотре высота столба масляной фракции не превышала 10 % от общей величины столба эмульсии.

2.2.9.3. Определение кинематической вязкости

Кинематическую вязкость определяют при помощи капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 (Россия) согласно инструкции изготовителя и выражали в мм²/с. Кинематическая вязкость вакцины должна иметь значение в пределах 20-150 мм²/с [150].

2.2.9.4. Определение концентрации водородных ионов (рН)

В общую испытуемую пробу (5-10 мл) препарата погружали электроды и отсчитывали значение рН через 30-60 с. Значение рН устанавливали по трем измерениям, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,1 единицы. Показатель рН вакцины должен быть в пределах 7,0-7,6 [150].

2.2.10. Определение безопасности инактивированной вакцины

Безопасность вакцины проверяли на овцах. Препарат вводили животным внутримышечно по 5 мл (5 доз/овец) с внутренней стороны бедра. В контрольной группе овец оставляли не привитыми. Наблюдали за вакцинированными животными 14 сут.

Вакцину считали безвредной и ареактогенной, если все привитые животные в течение всего срока наблюдения оставались живыми и клинически здоровыми.

2.2.11. Определение иммуногенности инактивированной вакцины

Иммуногенность вакцины проверяли на клинически здоровых невакцинированных овцах, козах и телятах 6-12 месячного возраста, средней

и выше средней упитанности. Для этих целей через 14-30 дней после вакцинации от привитых животных получали сыворотки и тестировали их в реакции нейтрализации (РН) и методом иммуноферментного анализа (ИФА) на способность нейтрализовать гомологичный вирус. После вакцинации проводили контрольное заражение двумя эпизоотическими штаммами 4 и 16 серотипов вируса в дозе по 5 мл смеси гомогената селезенки и вирулентной крови, титр вируса был равен $10^3 - 10^4$ ИД₅₀/мл. Одновременно такой же дозой заражали здоровых невакцинированных животных (контроли). После контрольного заражения за животными наблюдали в течение 21 сут. с ежедневной термометрией в течение 14 сут. Реакцию животных учитывали по 30-ти балльной шкале оценки признаков заболевания (табл. 2.2) [177].

Таблица 2.2 – Шкала оценки клинических признаков БТ у животных

Симптом	Степень выраженности симптомов	Оценка (балл.)
1	2	3
Лихорадка (температура 40,1°C и выше)	в течение 1-3 дней с пиком до 41 °С	1
	в течение 1-3 дней с пиком выше 41 °С	2
	в течение 4 и более дней с пиком до 41 °С	3
	в течение 4 и более дней с пиком выше 41 °С	4
Гиперемия и цианоз слизистых оболочек	слабовыраженная гиперемия	1
	резко выраженная гиперемия	2
	резко выраженная гиперемия с цианозом	3
Отек в области головы	слабо выраженный отек век или губ	1
	явный отек век или губ	3
	выраженный отек морды	4
Эрозии или кровоизлияния	наличие эрозий на слизистых оболочках или кровоизлияния на крыльях носа или носовом зеркале	3

Продолжение таблицы 2.2

1	2	3
Кератит	очаговое, краевое помутнение роговицы одного глаза	2
	полное помутнение роговицы одного глаза или частичное обоих глаз	3
	полное помутнение роговицы обоих глаз	4
Угнетение	легкое угнетение	1
	выраженное угнетение	2
	депрессия с отказом от корма	3
Поражение конечностей	слабовыраженная болезненность конечностей	1
	ярко выраженная болезненность конечностей и хромота	2
Слезотечение	наличие слезотечения	1
Носовое истечение	слизистого характера	1
	гнойного характера	2
Слюнотечение	слюнотечение или образование пены	1
Диарея	Понос	1
Истощение	Исхудание	1
	ярко выраженное истощение	2
Максимальная оценка в баллах		30

Напряженность иммунитета оценивали по индексу нейтрализации сывороток иммунизированных животных и по разнице клинической реакции (в баллах) у контрольных и вакцинированных животных: 0-7 баллов – отсутствие иммунитета; от 7 до 12 баллов – слабый иммунитет; от 12 до 16 баллов – умеренный иммунитет; свыше 16 баллов – выраженный иммунитет.

2.2.12. Определение 50 %-ой иммунизирующей дозы (ИмД₅₀) вакцины

ИмД₅₀ определяли объемным методом на овцах 6-мес. возраста. Для этого образцами вакцины, начиная с цельного и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32 прививали подкожно в дозе 1,0 мл по 6 гол. овец. У вакцинированных овец на 30 сут. после однократной вакцинации отбирали кровь для определения напряженности иммунитета в ИФА и подвергали контрольному заражению эпизоотическим штаммом ВБТ внутримышечно в дозе 10^{3,0} ЛД₅₀/мл. Клиническое наблюдение за инфицированными овцами вели в течение 21 сут. Расчет ИмД₅₀ проводили по формуле Кербера-Ашмарина [178]:

$$\lg \text{ИмД}_{50} = \lg D - \lg K \times (\sum L_i - 0,5), \quad (2.2)$$

где: $\lg D$ – \lg максимальная доза вакцины в исследованиях;

$\lg K$ – \lg кратность разведения вакцины в исследованиях;

L_i – отношение количества выживших овец к количеству зараженных овец в опыте;

\sum - сумма значений L_i для всех испытанных разведений вакцины.

Протективность вакцины (ПД₅₀) рассчитывали путем деления прививной дозы вакцины на значение ИмД₅₀ [150].

2.2.13. Определение наличия ВНА в реакции нейтрализации

Для определения в сыворотках крови животных опытной и контрольной группы ВНА отбирали кровь у контрольных и вакцинированных животных. Полученную сыворотку до использования подвергали инактивации при температуре 56 °С в течение 30 мин. Затем сыворотки двукратно разводили стерильным раствором PBS с 1:2 до 1:128. В приготовленные разведения сывороток в соотношении 1:1 добавляли вирус в дозе 200 ТЦД₅₀/мл и выдерживали при температуре 4 °С в течение 14-16 ч. Перед внесением в культуры клеток пробы выдерживали 1-1,5 часа при температуре 37±1 °С. В

качестве контроля использовали сыворотку крови здоровых животных, не содержащих ВНА к ВБТ.

Учет результатов РН проводили путем ежедневного просмотра пробирок с культурой под световым микроскопом. За титр антител принимали наивысшее разведение сыворотки, подавляющее развитие ЦПД вируса в 50% пробирок с инфицированной культурой клеток. Предельная активность сыворотки должна быть 1:32. Рабочий титр сыворотки равен его четырехкратному предельному титру.

2.2.14. Конкурентный метод ИФА для выявления антител к ВБТ

Для обнаружения антител к ВБТ использовали конкурентный ИФА набор производства «ID VET» (Франция) для обнаружения анти-VP7 антител. Постановку ИФА проводили в соответствии с инструкцией изготовителя.

При внесении в лунки микропланшета образцов исследуемых сывороток, антитела связываются на твердой фазе с антигеном. Затем вносится иммуноферментный конъюгат, образуя комплексы антиген – конъюгат-пероксидаза. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп - реагент. Процедура для постановки реакции состоит из следующих компонентов: 50 мкл контрольный образец, 50 мкл конъюгат, 50 мкл буфер, 100 мкл субстрат, 100 мкл стоп - раствор. Инкубирование при температуре 21–25 °С. Оптическую плотность контрольных и тестируемых образцов измеряли при 450 нм в микропланшетном фотометре. Интерпретацию результатов вычисляли по формуле 2.3:

$$SPI \% = \frac{ОП\ образца}{ОПк-} \times 100 \quad (2.3)$$

< 40 % считается отрицательным;

≥ 40 % считается положительным.

2.2.15. Постановка ПЦР в реальном времени

РНК вируса из образцов крови была выделена коммерческим набором QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкциям производителя. Для амплификации 5 сегмента вируса блутанга были использованы следующие праймеры и зонд: BTV-S5-F (ggcaacyassaacatgga), BTV-S5-R (aaagtyctcgtggcattwgc) и BTV-S5-probe (fam-cyccactgatrttgattttctcaatamra) [194]. Вирусный геном оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием набора Superscript[®] III Platinum One-Step системы (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции изготовителя. Реакции проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 Series (Qiagen, Германия) со следующей программой: 1 цикл обратной транскрипции при 55 °C в течение 30 мин, 1 цикл 95 °C в течение 10 минут, а затем 50 циклов 95 °C в течение 15 с, 58 °C в течение 30 с.

2.2.16. Статистическая обработка результатов

Все статистические анализы проводились в GraphPadPrism[®] версии 6.0. Рассчитывали средние значения температуры тела животных, данные серологии, клинические признаки заболевания животных с выведением стандартной ошибки. Разница в результатах по оценке клинических признаков заболевания между группами рассчитывалась по критерию Стьюдента, где значение $P \leq 0.05$ считали достоверным. Разницу в эффективности между группами сравнивали с односторонним точным тестом Фишера в двух пропорциях при значительном уровне альфа $<0,05$. Значимость всех опубликованных величин была не ниже первого критериального порога ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Серомониторинг животных Южного Казахстана на наличие антител ВБТ

Для определения сероположительных на БТ животных в течение 2017 г. проводили экспедиционные выезды в Туркестанскую, Жамбылскую и Алматинскую области (рис.3.1).

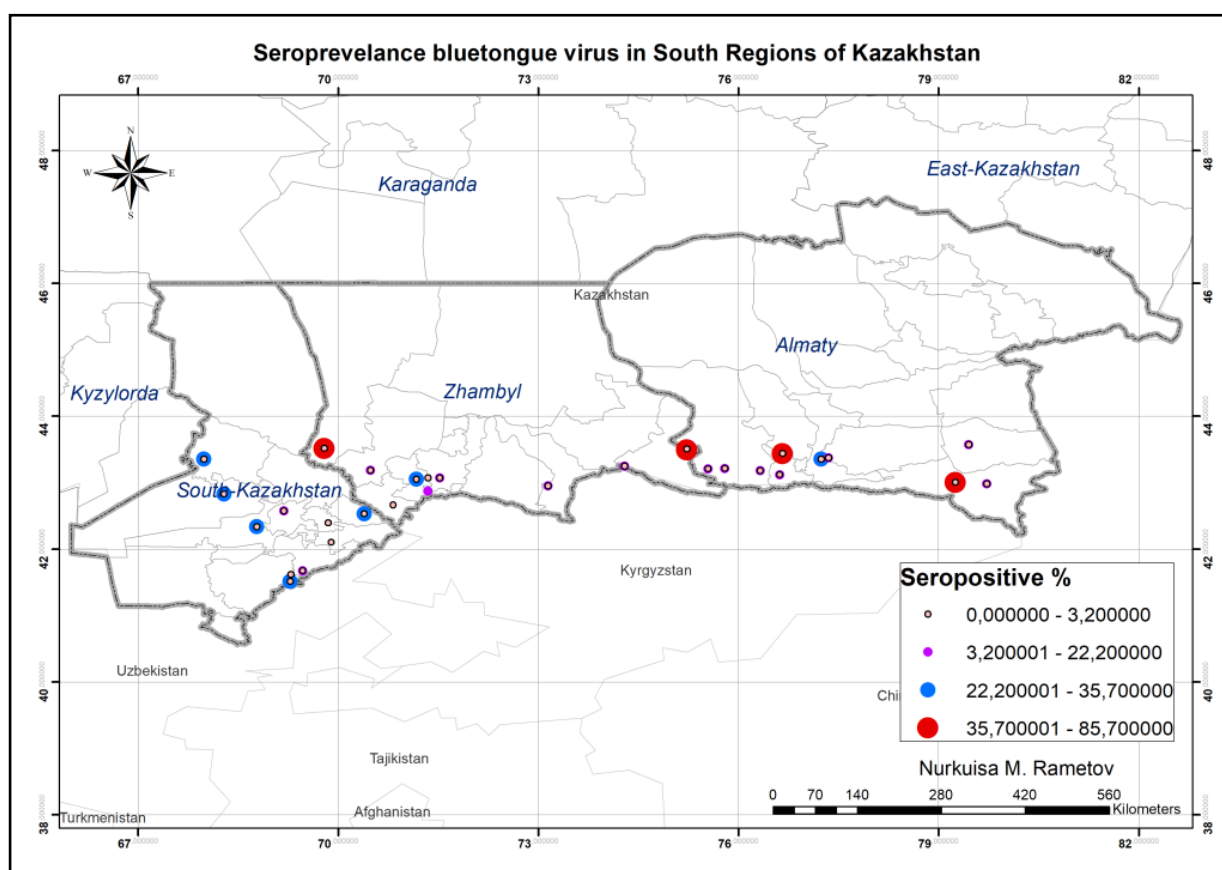


Рис. 3.1. Карта серомониторинговых исследований на БТ в южных регионах
Казахстана

Во время мониторинговых исследований, нами были собраны 730 проб сыворотки крови от КРС и МРС (рис. 3.2). В том числе в Алматинской области

– 110 проб от КРС (26,19 %) и 310 проб от МРС (73,81 %), также соответственно из Жамбылской области – 50 проб от КРС (26,32 %) и 140 МРС (73,68 %), в Туркестанской области – 30 КРС (25,0 %) и 90 МРС (67,5 %).

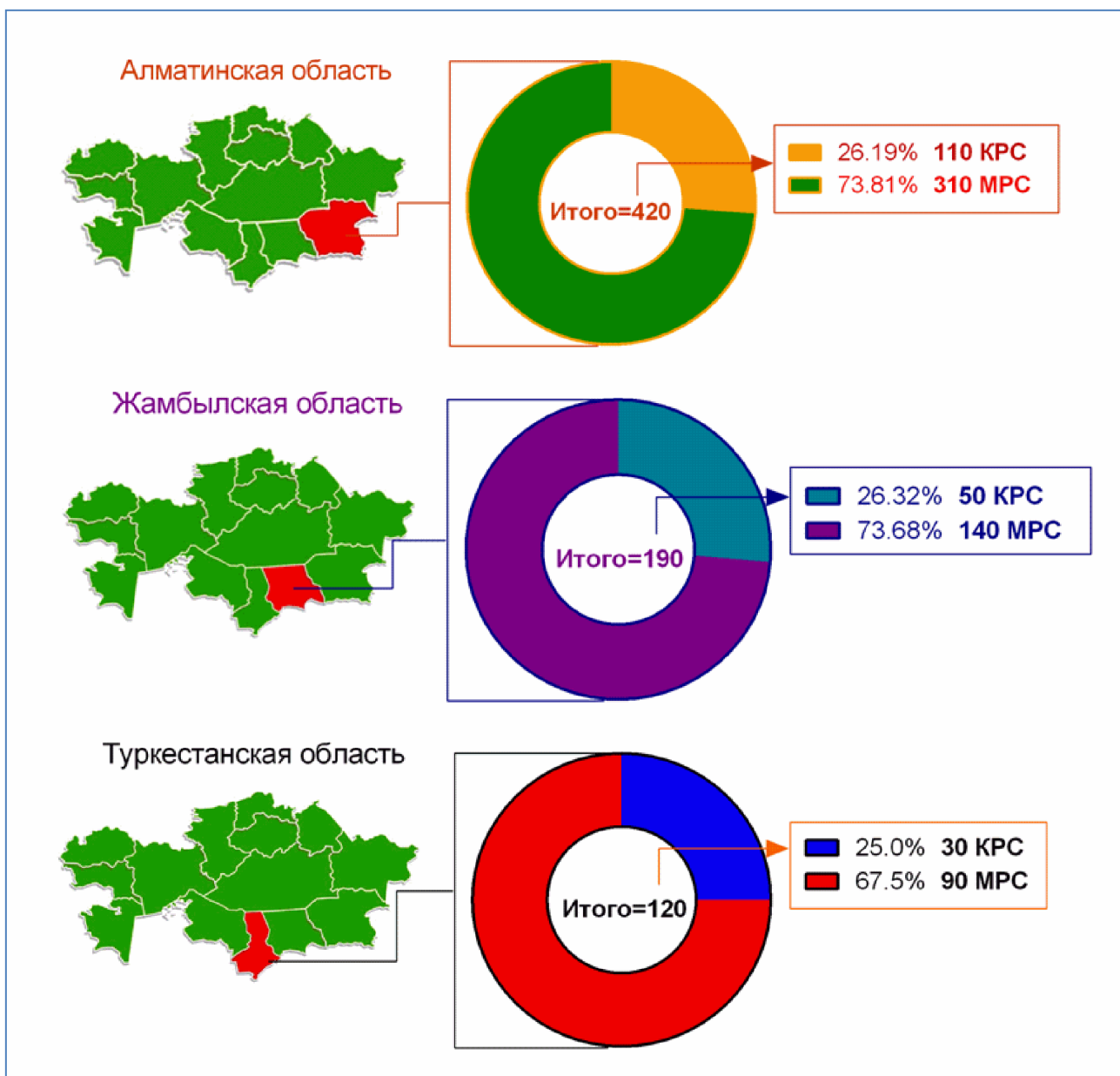


Рис. 3.2. Количество собранных образцов по трем областям

Полученные пробы доставлены в лабораторию, где проводили серологические исследования с использованием ИФА. Результаты исследований на обнаружении антител к ВБТ по Алматинской области представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1 - Результаты исследований на БТ животных по Алматинской области

Наименование районов	Вид животного	Всего исследовано животных по району	Количество положительно реагирующих животных	Процент положительно реагирующих животных
Райымбекский	КРС	11	1	9,1
	МРС	31	0	0
Кегенской	КРС	11	7	63,6
	МРС	31	0	0
Уйгурский	КРС	11	1	9,1
	МРС	31	1	3,2
Енбекшиказахский	КРС	11	2	18,2
	МРС	31	0	0
Талгарский	КРС	11	0	0
	МРС	31	8	25,8
Илиский	КРС	11	7	63,6
	МРС	31	0	0
Карасайский	КРС	11	0	0
	МРС	31	3	9,6
Жамбылский с/о Узынагаш	КРС	11	1	9,1
	МРС	31	1	3,2
Жамбылский, с/о Дегересский	КРС	11	1	9,1
	МРС	31	1	3,2
Жамбылский, с/о Актерекский	КРС	11	2	18,2
	МРС	31	0	0
Итого	КРС	110	22	20
	МРС	310	14	4,51

По результатам проведенных исследований установлено, что в Алматинской области, в Райымбекском и Илийском районах наиболее высокий положительный результат на БТ зафиксирован среди КРС - 63,6 %. В Енбекшиказахском и Жамбылском районах подтвердилось присутствие антител к ВБТ в 18,2 % проб. В остальных районах (за исключением Талгарского и Карасайского районов) обнаружены антитела к ВБТ среди КРС в среднем 9,1%.

Среди МРС по Алматинской области, самый высокий процент положительно реагирующих выявлен в Талгарском районе - 25,8 %. В Уйгурском, Карасайском и Жамбылском районах выявлены серопозитивные животные к ВБТ в пределах от 3,2 до 9,6 %. В остальных районах, среди МРС наличие антител к ВБТ не обнаружено.

Далее нами были проведены ПЦР анализ на пробах, которые дали положительные реакции в ИФА. Результаты представлены на рис. 3.3.

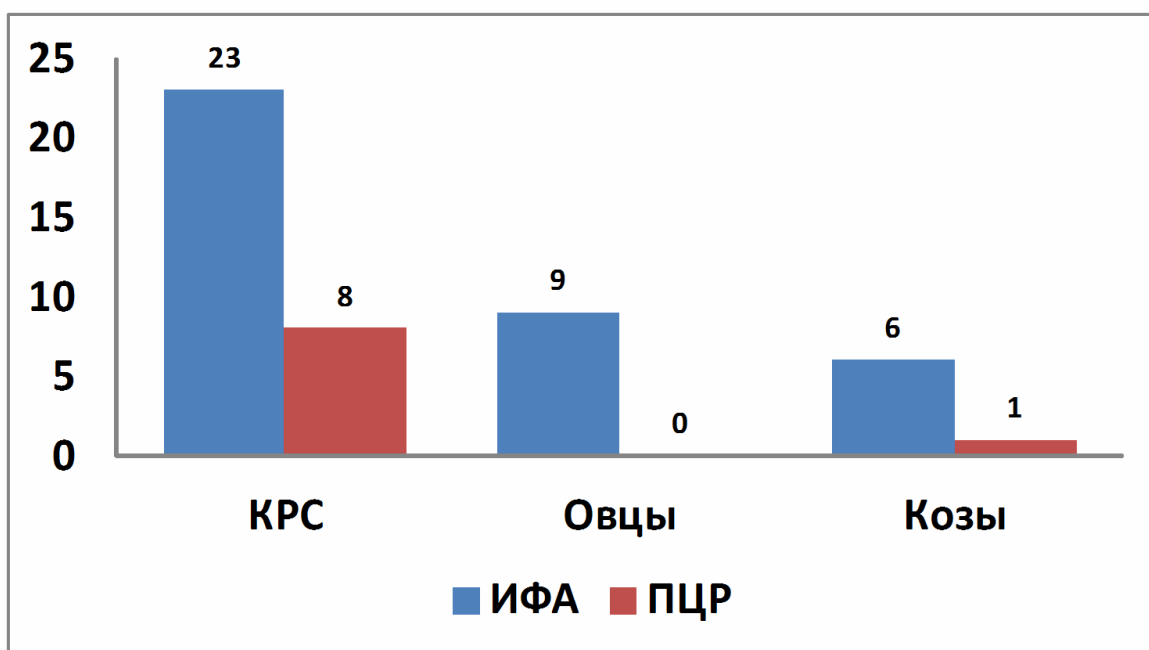


Рис. 3.3. Сравнительные результаты серологического и молекулярного исследования положительных проб по Алматинской области

Как видно из данного рис. 3.3, что из 23 положительных проб КРС в 8 пробах была обнаружена РНК вируса блутанга в реал-тайм ПЦР. Среди овец из 9 положительных проб не была подтверждена РНК вируса, тогда как в 1 из 6 проб у коз была подтверждена РНК вируса БТ.

Далее нами были исследованы пробы, отобранные у КРС и МРС в Жамбылской области, результаты которых представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.2 – Результаты исследований на БТ по Жамбылской области

Наименование районов	Вид животного	Всего исследовано животных по району	Количество положительно реагирующих животных	Процент положительно реагирующих животных
1	2	3	4	5
г. Тараз	КРС	5	1	20
	МРС	14	0	0
Байзакский	КРС	5	0	0
	МРС	14	3	21,4
Жамбылский	КРС	5	0	0
	МРС	14	5	35,7
Жуалинский	КРС	5	0	0
	МРС	14	0	0
Кордайский	КРС	5	1	20
	МРС	14	0	0
Т. Рыскулова	КРС	5	0	0
	МРС	14	2	14,3
Меркенский	КРС	5	3	60
	МРС	14	8	57,1

Продолжение таблицы 3.2

1	2	3	4	5
Сарысуский	КРС	5	0	0
	МРС	14	12	85,7
Таласский	КРС	5	0	0
	МРС	14	2	14,3
Шусский	КРС	5	0	0
	МРС	14	0	0
Итого	КРС	50	5	10
	МРС	140	32	22,9

В Жамбылской области наиболее высокой процент антител на БТ у КРС наблюдается в Меркенском районе (60 %), тогда как в г. Тараз и в Кордайском районе – 20 %. В остальных районах Жамбылской области не выявлены антитела к БТ среди КРС. Самые высокие показатели сероположительных проб среди МРС по Жамбылской области наблюдаются в Сарысусском, Меркенском, Жамбылском районах - 85,7 %, 57,1% и 35,7 %, соответственно. В Байзакском, Т.Рыскулова, Таласском районах процент положительно реагирующих животных составил от 14,3 до 21,4 %. В Жуалинском и Шусском районах не обнаружены антитела к ВБТ среди КРС и МРС.

Далее нами были проведены ПЦР анализ на пробах, которые дали положительные реакции в ИФА. Результаты представлены на рис. 3.4.

Таким образом, из 24 положительных проб овец в 7 пробах были обнаружены РНК вируса блутанга в реал-таим ПЦР. Среди КРС из 4 положительных проб не была подтверждена РНК вируса, тогда как 2 из 4 проб у коз РНК вируса БТ была подтверждена.

Также нами были исследованы пробы, отобранные у КРС и МРС в Туркестанской области, результаты представлены в табл. 3.3.

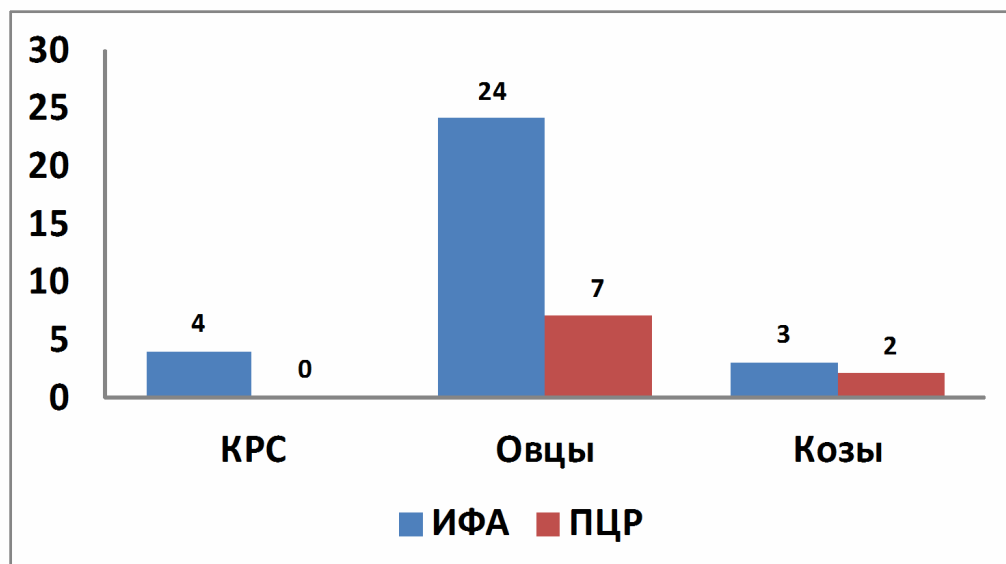


Рис. 3.4. Сравнительные результаты серологического и молекулярного исследования положительных проб по Жамбылской области

Таблица 3.3 - Результаты исследований на БТ по Туркестанской области

Наименование районов	Вид Животного	Всего исследовано	Количество положительно реагирующих животных	Процент положительных животных
1	2	3	4	5
Туркестанский	КРС	3	0	0
	МРС	9	3	33,3
Отырарский	КРС	3	0	0
	МРС	9	3	33,3
Арысский	КРС	3	0	0
	МРС	9	3	33,3
Ордабасинский	КРС	3	0	0
	МРС	9	1	11,1

Продолжение таблицы 3.3

1	2	3	4	5
Сарыагашский	КРС	3	0	0
	МРС	9	3	33,3
Мактааральский	КРС	3	0	0
	МРС	9	0	0
Казыгуртский	КРС	3	0	0
	МРС	9	2	22,2
Толебийский	КРС	3	0	0
	МРС	9	0	0
Сайрамский	КРС	3	0	0
	МРС	9	0	0
Тулкибасский	КРС	3	0	0
	МРС	9	3	33,3
Итого	КРС	30	0	0
	МРС	90	18	20

В Туркестанской области исследования животных на БТ проводились в 10 районах, и среди КРС серопозитивные животные не выявлены. Однако в некоторых районах были обнаружены антитела к ВБТ у МРС. В частности, в Туркестанском, Отырарском, Арыском, Сарыагашском и Тулкибасском районах были исследованы в ИФА по 9 проб сывороток крови МРС, из них в 3 пробах в каждом районе установлен положительный результат. В данных районах процент положительно реагирующих животных составил 33,3 %. В Казыгуртском районе исследованы 9 проб сывороток крови, из них 2 пробы оказались положительными, что составило 22,2 %. В Ордабасинском районе исследован также 9 проб сыворотки крови, антитела к вирусу обнаружены только в 1-й пробе (11,1 %). В Мактааральском, Толебийском и Сайрамском районах исследовано всего 33 пробы сывороток крови, все пробы показали

отрицательный результат. Всего по области было исследовано 120 проб сывороток крови, взятых у КРС и МРС, положительный результат выявлен в 18 пробах (20 %).

Далее нами были проведены ПЦР анализ на пробах, которые дали положительные реакции в ИФА. Результаты представлены на рис. 3.5.

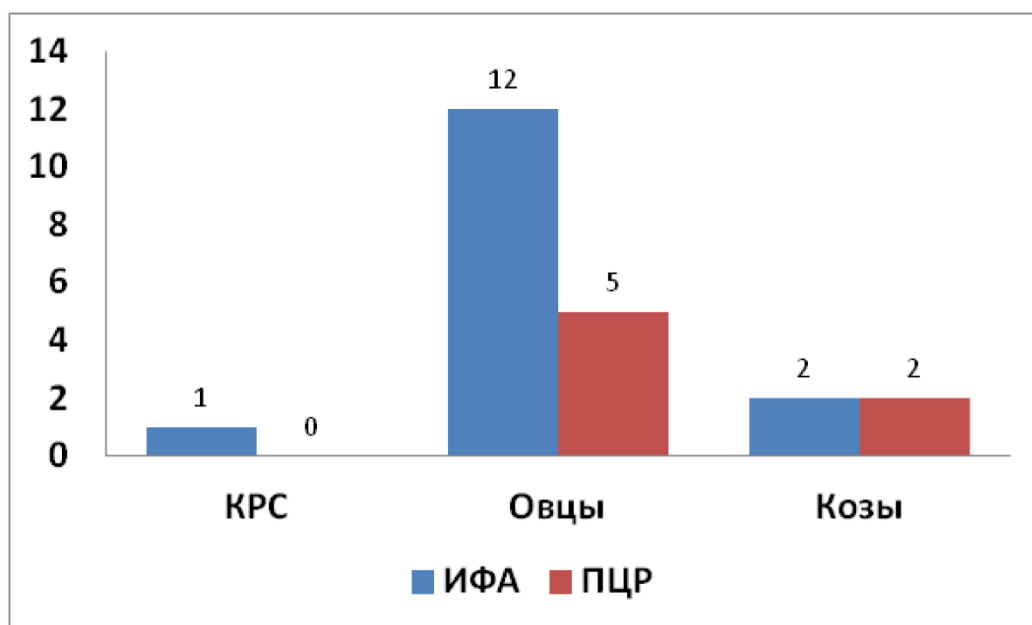


Рис.3.5. Сравнительные результаты серологического и молекулярного исследования положительных проб по Туркестанской области

Как видно из данного рис. 3.5, что из 12 положительных проб у овец в 5 пробах были обнаружены РНК вируса БТ в реал-тайм ПЦР. Среди КРС из 1 положительной пробы РНК вируса не подтверждена, тогда как 2 из 2 проб у коз РНК вируса БТ был подтвержден.

Результаты проведенных исследований показывают, что антитела к структурному белку VP7 ВБТ содержатся в сыворотках крови исследованных животных южных областей Казахстана. Полученные данные свидетельствуют о наличии ВБТ среди данных видов животных. Однако официальных сообщений о заболевании животных не было, и нами в ходе мониторинга не были обнаружены больные или подозрительные животные.

Наличие серопозитивных животных в южных областях Казахстана вероятнее всего связано с активными перелетами переносчиков инфекции.

В результате проведенных исследований установлено, что антитела в сыворотках крови МРС к ВБТ содержались в 12,5 % случаев, также 35,3% сывороток крови КРС были положительными, что свидетельствует о наличии ВБТ. Из полученных данных установлено, что к структурным белкам VP7 ВБТ положительно реагировали только взрослые животные в возрасте старше 1,5 года. Детальный анализ показал, что возраст положительно реагирующих животных составляет 2,5-4,5 года.

Аналогичные исследования были проведены в Казахстане в конце 90-ых годов прошлого столетия Британскими учеными, где впервые в 2003 году сообщалось о присутствии ВБТ [8]. По их данным были проанализированы образцы крови, собранные у 958 голов домашних жвачных животных и 513 диких сайгаков на территории центрального Казахстана, у которых при тестировании серопревалентность составили среди домашних жвачных животных 23,2%, а среди сайгаков 0%. Серопревалентность среди домашних скотов не различались по видам, но значительно увеличивались с возрастом. Эти данные согласуются с нашими результатами полученных в ходе проведенных мониторинговых исследований. При этом следует отметить, что исследования, проведенные британскими учеными, анализированы только к результату серологических методов. Поэтому, результаты исследований по выявлению вируса и его потенциального переносчика не отражены в их статьях. Наши исследования обоснованы на результатах серологических и молекулярных исследований, в которых были обнаружены серопозитивные животные, вирусы и возможные потенциальные переносчики (Результаты по определению потенциальных переносчиков в данной диссертации не приведены и не опубликованы).

Таким образом, сравнительные анализы на основе литературных данных и собственные результаты подтверждают, что данная инфекция является

эндемичным, в которой постепенно преобладает природно-очаговый характер на территории южных регионов Казахстана. Эти доказательства не отрицают актуальность блутанга для разработки комплексной профилактики здоровья животных в этом регионе.

3.2. Изучение некоторых иммунобиологических свойств различных штаммов вируса блутанга, хранящихся в Коллекции микроорганизмов НИИПББ

Изучение иммунобиологических свойств ВБТ проводили с целью подбора штамма, необходимого для конструирования инактивированной вакцины против данной инфекции. По общепринятому представлению для таких целей следует выбрать штамм, который является апатогенным, активно размножается в различных типах тканевых культур с проявлением цитопатогенного действия и обладает высокой иммуногенной активностью. Кроме того, штамм должен быть эпидемически актуальным для включения в состав вакцины и выделен из местных эпизоотических очагов. С учетом этих требований в серии экспериментов сравнивали патогенность, культуральные и иммуногенные свойства различных штаммов ВБТ.

Данные литературных источников показывают, что ВБТ размножается в однослойной культуре почечного эпителия эмбрионов КРС и ягнят, клеток легких, селезенки, печени, а также на хориоаллантаической оболочке и в желточном мешке развивающихся куриных эмбрионов.

В экспериментах по определению чувствительной системы культивирования использовали штаммы «874», «134», «Gil-Gil», «Хуросон-07/04» и «RT/RIBSP-07/16» ВБТ, хранящиеся в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ. Исследования проводили на овцах, мышатах-сосунах, 8-10 сут. РКЭ.

Вирусом эпизоотических штаммов заражали овец внутривенно в дозе 2 мл. Мышат сосунов заражали интрацеребрально в дозировке 0.03 мл, а РКЭ – в желточный мешок в дозе 0.2 мл. Титр вируса в материале, используемом для заражения, колебался от 5.0-6.0 lg ТЦД_{50/мл}.

Опыты показали, что патогенность рассматриваемой группы штаммов соответствует их паспортным данным.

Эпизоотические штаммы у овец вызывали симптомы заболевания, характерные для БТ. Наиболее показательными признаками болезни являлись: повышение температуры тела до 41,0-41,5° С, угнетение, истечение из носовой полости и глаз, одышка, отек в области головы и шеи, хромота, отказ от корма, а иногда расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта. Выраженность клинических признаков зависела от штамма, используемого для заражения (табл. 3.4.).

Таблица 3.4 – Патогенность эпизоотических штаммов ВБТ для овец

Штамм	Пассаж на овцах	Доза вируса, ИД _{5/мл}	Результаты заражения			Оценка признаков, в баллах
			заражено	пало	выздоровело	
874	2	1000	3	3	0	30
134	2	1000	3	3	0	30
Gil-Gil	2	1000	3	1	2	25,4
RT/RIBSP07/16	3	10 000	6	1	5	24,3
Хуросон07/04	3	10 000	6	0	6	24.0

Наиболее агрессивным оказались штаммы «874» и «134», которые вызывали 100% гибели зараженных животных. Наименьшая патогенность была характерна для штаммов Gil-Gil, Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16, способных вызывать заболевание, заканчивающееся в большинстве случаев выздоровлением. Штаммы Gil-Gil и RT/RIBSP07/16 по патогенности для

овец занимали промежуточное положение, так как летальность среди зараженных ими животных не превышала 40-70%.

Штамм Хуросон07/04 обладал более характерным свойством к вакцинным штаммам, и он являлся практически апатогенным для овец. На его введение животные реагировали лишь только сравнительно невысоким повышением температуры тела, легким угнетением и незначительной гиперемией видимых слизистых оболочек, которые наблюдались лишь только у отдельных животных.

Дальнейшая серия опытов нами проведена по определению репродуктивных свойств ВБТ на развивающихся куриных эмбрионах 8-10 сут. возраста при заражении в аллантоисную полость (АП), хориоаллантоисную оболочку (ХАО) и желточный мешок (ЖМ). При проведении первого пассажа эмбрионы инфицировали разведенным вирусом в соотношении 1:3 стерильным физиологическим раствором в АП, ХАО и ЖМ по 0,2 мл. Инфицированные зародыши инкубировали в условиях термостата с соблюдением необходимых параметров (температура, влажность, воздухообмен).

Результаты показали, что при проведении первого пассажа при заражении в АП отмечена гибель 2 зародышей, инфицированных штаммов «874» на первые сутки, и 2 эмбрионов, зараженных штаммом «134» на вторые сутки. Погибшие на первый день эмбрионы браковали, погибших на 2-е сутки и оставшихся в живых в течение 5 сут. охлаждали, и в зависимости от способа заражения собирали по отдельности АП, ХАО и ЖМ. При вскрытии после охлаждения, как у погибших, так и живых зародышей видимых изменений не обнаружили.

Для проведения второго пассажа использовали органно-тканевую суспензию желточных мешков. Эксперименты проводили на 8 сут. РКЭ при инфицировании в желточный мешок по 0,2 мл. На первые сутки отмечена гибель одного зародыша инфицированного штаммом «134», 4-х эмбрионов

зараженных штаммом «874» и 3-х эмбрионов инфицированных штаммом «Gil-Gil». Проведенные исследования показали, что в течение 7-сут. инкубирования погибло от 50 до 70% инфицированных эмбрионов. При вскрытии погибших зародышей, инфицированных штаммом «134», отмечены кровоизлияния по всему телу. У эмбрионов, погибших после заражения штаммом «874», изменений не отмечено. Для проведения следующего пассажа собраны желточные мешки, как живых, так и мертвых эмбрионов.

При проведении дальнейших исследований по адаптации вируса к куриным эмбрионам установлено, что на третьем пассаже отмечена 100% гибель инфицированных зародышей на 3 сут, а при проведении 4-го пассажа гибель зародышей наступила на 2-е сутки. Погибшие эмбрионы при вскрытии были вишневого цвета, с кровоизлияниями по всему телу. Таким образом, в результате проведенных работ установлено, что штаммы «134» и «874» ВБТ вызывают гибель 8-10 дневных куриных эмбрионов. По мере пассирования отмечено увеличение количества погибших эмбрионов от 50% в первых пассажах и до 100% на 4-м пассаже.

В литературе имеются данные, по выделению ВБТ на куриных эмбрионах, зараженных в желточный мешок и внутривенно. Авторы показали превосходство второго метода инфицирования. При сравнительном титровании на эмбрионах вируса первого эмбрионального пассажа активность его при внутривенной инокуляции была выше на 3,0 lg титра, который определялся при заражении в желточный мешок. По данным авторов при внутривенной инокуляции вируса уже в первом пассаже наблюдается 100%-ная гибель эмбрионов [126].

Для подтверждения этих данных нами проведен эксперимент по определению чувствительности эмбрионов при внутривенном заражении штаммами «134» и «874» ВБТ. Эксперименты проводили на 13-сут. на куриных эмбрионах, в качестве вирусного материала использовали вирус, прошедший 1 пассаж на РКЭ. При интравенозном заражении эмбриональную

суспензию разводили 1:1000 и инокулировали по 0,1 мл, контролируя правильность введения под овоскопом. При проведении этого опыта гибель 90% эмбрионов отмечена через 37 час, остальные 10% зародышей погибли через 60 часов после инфицирования. При вскрытии погибшие эмбрионы были вишневого цвета с кровоизлияниями, данные представлены на рис. 3.6.

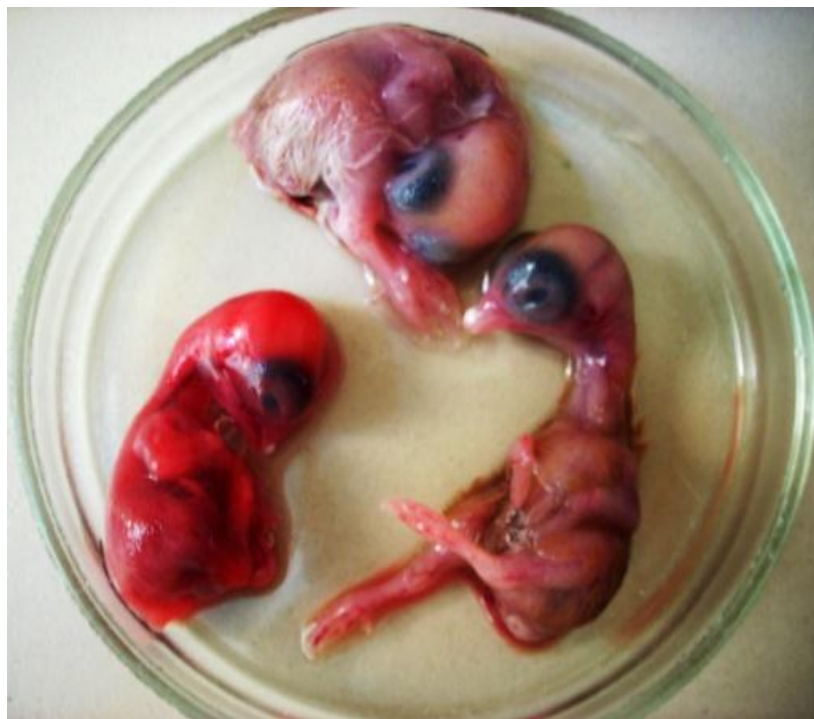


Рис. 3.6. Погибшие эмбрионы после интравенозного инфицирования вирусом БТ

Как ранее уже было указано, в литературе имеются сообщения, что предварительно пассированный на куриных эмбрионах вирус, быстрее адаптируется на мышатах сосунах.

Для выяснения этих сведений нами проведены исследования по определению чувствительности новорожденных мышат сосунов к вирусу БТ. Эксперименты провели на 3-5 дневных мышатах – сосунах (рис. 3.7) путем интрацеребрального заражения (рис. 3.8).



Рис. 3.7. Мышата-сосуны в 3-5-дневном возрасте

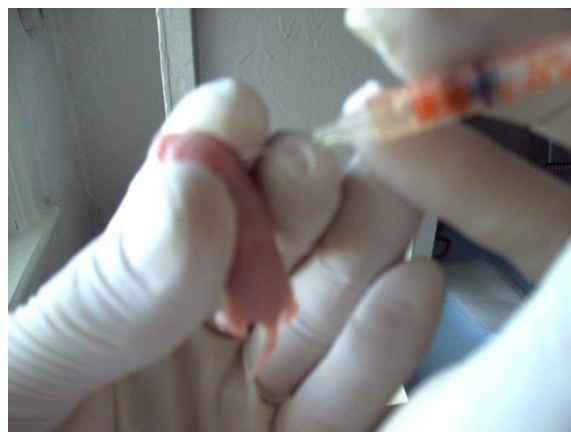


Рис. 3.8. Интрацеребральное заражение вирусом

В качестве материала для инфицирования использовали эмбриональную суспензию 1-го пассажа на желточном мешке, разведенную 1:5 стерильным физиологическим раствором. Проведенными исследованиями установлено, что в первом пассаже через 10-12 час. после инфицирования зараженные мышата покидают помет, уползая в разные углы клетки, становятся угнетенными, за 2-3 час. до гибели впадают в коматозное состояние. В результате проведенного эксперимента на первом пассаже 6 мышат погибли через 20 час. после инфицирования, 2 мышонка – через 36 час. (рис. 3.9) и один мышонок остался живым. При вскрытии погибших мышат обнаруживали кровоизлияния в легких и селезенке (рис 3.10).



Рис. 3.9. Погибшие мышата после интрацеребрального заражения ВБТ



Рис. 3.10. Вскрытие погибшего мышонка после заражения

В качестве вирусосодержащего материала собирали головной мозг и готовили 10%-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе.

При проведении второго пассажа отмечено, что инфицированные мышата покидают помет, прекращают прием молока, и до наступления гибели находятся в угнетенном состоянии. Первая гибель 4 мышат отмечена через 23 час. 40 мин. после инфицирования, спустя три часа пали еще 3 мышонка, один остался в живых. От павших мышат собран головной мозг (рис. 3.11) и приготовлена органо-тканевая суспензия.



Рис. 3.11. Сбор мозговой ткани мышат-сосунов после инфицирования вирусом

Для проведения третьего пассажа использовали мышат 5-дневного возраста, которых заразили разведенной 1:5 органо-тканевой мозговой суспензией. В результате проведения опыта установлено, что зараженные мышата пали через 18 час. после инфицирования. При вскрытии обнаружено геморрагическое кровоизлияние в легких, печень коричневато-зеленого цвета (рис. 3.12), также отмечено кровоизлияние в головном мозге у одного мышонка (рис. 3.13).

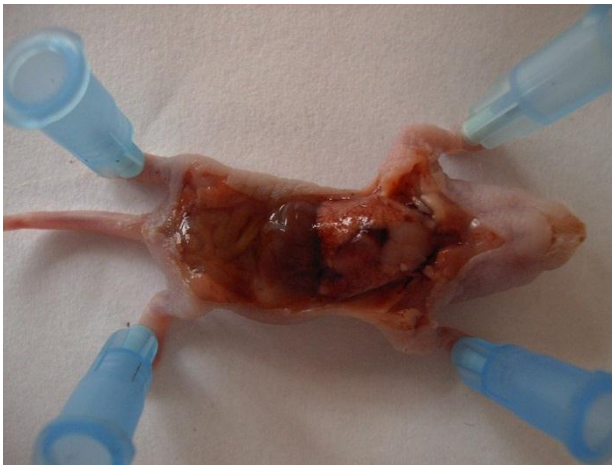


Рис. 3.12. Геморрагическое кровоизлияние во внутренних органах мышонка



Рис. 3.13. Геморрагическое кровоизлияние в головном мозге Мышат

Для подтверждения наличия вируса в пассажных пробах были проведены электронно-микроскопические исследования. Результаты этих исследований показали, что в исследуемых пробах был обнаружен вирус в низких титрах $\sim 2-3 \text{ Ig}$.

Изучение патогенности различных штаммов ВБТ на восприимчивых животных, а также на чувствительных лабораторных моделях весьма важны. Так, для включения в состав вакцинного препарата выбранный штамм должен быть тщательно изучен, особенно в отношении патогенности. Следует отметить, что вирус БТ обладает исключительной пластичностью. В силу этого вирулентные, а следовательно, и патогенные свойства его могут подвергаться значительным изменениям. Это положение полностью подтверждается накопленными данными о неодинаковой вирулентности штаммов, выделенных в различных очагах и при различных формах заболевания. Иллюстрацией к изложенному, могут служить данные об активности американских и африканских штаммов [63, 103, 139]. Так, по наблюдениям авторов, африканские штаммы ВБТ обладают очень высокой вирулентностью для овец, вызывая 50% смертности среди больных животных. В то же время, американские штаммы этого вируса способны

были вызывать у животных лишь легкие формы заболевания, которые в большинстве случаев заканчивались выздоровлением. Нами проведенные исследования также подтверждают, что имеющиеся у нас эпизоотические штаммы обладают различной патогенностью для овец. По отношению к мышам-сосунам штаммы «874», «134» и Gil-Gil проявляют одинаковую патогенность. Штаммы Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16 по патогенности для РКЭ не различаются между собой. При этом установлена, что гибель 50-70% инфицированных эмбрионов на первом и втором пассажах, а дальнейшее пассирование вируса в РКЭ приводило к повышению патогенности для эмбрионов. С целью адаптации вируса на мышатах сосунам при интрацеребральном заражении установлено, что по мере пассирования укорачивается длительность культивирования и повышается патогенность вируса для мышат, где гибель отмечена с 36 час. на первом пассаже до 18 час. на третьем пассаже.

Сравнительное изучение чувствительных культур клеток к различным штаммам ВБТ

По данным многих исследователей, к ВБТ чувствительны многие виды непереживаемых и переживаемых культур клеток. Наиболее активно этот вирус размножается в первично-трипсинизированных культурах клеток эмбриона овцы, почки ягненка, и переживаемых культурах клеток Vero и ВНК-21. Исходя из этих данных, нами была испытана чувствительность первичной культуры клеток ПЯ и переживаемых линиях Vero и ВНК-21 к эпизоотическим штаммом «874», «134», Gil-Gil, Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16.

При проведении исследований культуры клеток инфицировали разведенной питательной средой в соотношении 1:100 вирусом, наработанным в культуре клеток ПСГК (1 пассаж). Инкубирование проводили в стационарных условиях, без смены поддерживающей среды в

течение 5 сут. или до поражения 80-90% клеточного монослоя. Сбор вирусной суспензии проводили путем охлаждения клеток в бытовом холодильнике при $t 6\pm 2$ °С в течение ночи. После отделения клеток от стекла, суспензию тщательно перемешивали, брали пробу и определяли биологическую активность в соответствующих культурах путем титрования по общепринятой методике. Активность полученных суспензий высчитывали по Риду и Менча. Результаты данных исследований показаны в табл. 3.5.

Таблица 3.5 – Чувствительность культур клеток к вирусу БТ

Штаммы	Пассаж	Культуры клеток и титр ивруса, lg ТЦД ₅₀ /мл		
		ПЯ	Vero	ВНК-21
«874»	1	1,13±0,11	2,14±0,10	2,21±0,12
	2	1,21±0,17	2,17±0,11	2,13±0,10
	3	2,17±0,11	2,21±0,13	2,33±0,21
«134»	1	1,13±0,11	2,14±0,10	3,21±0,12
	2	1,75±0,17	2,17±0,19	2,13±0,12
	3	2,20±0,11	2,21±0,13	3,33±0,22
Gil-Gil	1	1,75±0,17	2,17±0,19	2,13±0,12
	2	1,21±0,17	2,17±0,11	2,13±0,10
	3	1,13±0,11	2,14±0,10	2,21±0,12
Хуросон07/04	1	5,83±0,08	5,91±0,16	4,12±0,07
	2	4,91±0,16	5,12±0,13	6,58±0,22
	3	4,83±0,08	5,25±0,11	6,51±0,21
RT/RIBSP07/16	1	4,66±0,18	4,75±0,18	6,20±0,12
	2	4,12±0,07	6,58±0,22	6,66±0,22
	3	6,18±0,02	6,75±0,11	6,81±0,22

Из данных табл. 3.5 видно, что титры вируса штаммов «874», «134» и Gil-Gil в различных тестируемых культурах клеток были существенно ниже

($p < 0.05$), чем других штаммов. При этом титры вируса наблюдались в пределах от 1.0 до 3.5 lg ТЦД_{50/мл}, тогда как биологические активности штаммов Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16 составляли в титрах от 4.0 до 6.5 lg ТЦД_{50/мл}. Также, из данных табл. 3.5 видно, что перевиваемые линии Vero и ВНК-21 являются более чувствительными к различным штаммам вируса БТ по сравнению с первичной культуры клеток ПЯ. При заражении примерно одинаковыми дозами вируса цитопатологические действия эпизоотических штаммов в культурах клеток Vero и ВНК-21 обнаруживались в более ранние сроки после заражения, чем в первичной линии ПЯ. Из рассматриваемых штаммов наибольшей цитопатогенной активностью по отношению Vero и ВНК-21 обладал штаммы Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16, цитопатогенное действие которого обнаруживалось на 1-2 день после заражения. Цитопатогенная активность штаммов «874», «134» и Gil-Gil была несколько меньшей, и обнаруживалось только на 5-7 сут. после инфицирования. Иными словами, для проявления ЦПД этих штаммов в данных культурах клеток необходима более длительная адаптация. Таким образом, установлено, что штаммы «874», «134» и Gil-Gil, хранящиеся в Коллекции микроорганизмов НИИПББ не вызывают ЦПД в культурах клеток, однако являются патогенными для овец, РКЭ и новорожденных мышат – сосунов. Эти штаммы в дальнейшем были использованы в качестве вирулентного штамма при контрольном заражении вакцинированных животных для оценки протективных свойств вакцинного препарата.

Для оценки накопления вируса БТ 4 и 16 серотипов (штаммы Хуросон07/04 и RT/RIBSP07/16) проводили сравнительные эксперименты в других перевиваемых линиях. Проведенные исследования показали, что в других культурах клеток вирус репродуцируется с проявлением ЦПД, и накапливается в довольно высоких титрах (табл. 3.6).

Таблица 3.6 – Сравнительное изучение культуральных свойств ВБТ в различных перевиваемых линиях

Культура клеток	Проявление ЦПД	Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл		Результаты электронно-микроскопических исследований
		ВБТ4	ВБТ16	
ПСГК	округлые клетки собирающиеся в гроздь	6,12±0,25	6,22±0,52	Целые вирионы и РНП
КГ-91	округлые клетки собирающиеся в гроздь	4,66±0,18	5,33±0,12	не исследовали
ВНК-21	деструкция клеток и отслоение от стекла	7,50±0,23	7,25±0,11	Целые вирионы и РНП
ПО	деструкция клеток и отслоение от стекла	5,10±0,20	6,00±0,12	не исследовали
Vero	деструкция клеток и отслоение от стекла	7,50±0,00	7,20±0,17	Целые вирионы и РНП
ПС	деструкция клеток и отслоение от стекла	7,25±0,25	7,11±0,08	Целые вирионы и РНП

Данные табл. 3.6 показывают, что эти серотипы накапливаются в указанных перевиваемых культурах клеток в более высоких титрах по сравнению с другими эпизоотическими штаммами.

Одним из характерных проявлений цитопатогенных изменений в перевиваемых культурах клеток являлись округление клеток, собранных в гроздь и рассеяных по всей поверхности монолоя. Вскоре после появления ЦПД клетки разрушались и отделялись от стенок сосуда.

В результате проведенных исследований установлено, что вирус БТ в первичных и перевиваемых культурах вызывает деструктивные изменения в монослое клеток и накапливается в довольно высоких титрах. Проверка

наработанных суспензий в электронной микроскопии показала наличие вирионов в исследуемых образцах.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлена высокая чувствительность к вирусу БТ перевиваемых клеточных линий Vero, ВНК-21 и др. Эти виды культур наиболее полно отвечают требованиям изготовления инактивированных и живых вакцин. Однако, в дальнейших экспериментах использовали культуры клеток ВНК-21 и ее суспензионный вариант.

Сравнительное изучение иммуногенной активности различных штаммов ВБТ

Перед проведением этих опытов нами были наработаны вирусосодержащие материалы из различных эпизоотических штаммов ВБТ в культуре клеток ВНК-21. После наработки определяли биологическую активность вируса в соответствующей культуре клеток путем титрования по общепринятой методике. Титры вируса для штаммов «874», «134» и Gil-Gil были в пределах 3.5-4.0 lg ТЦД₅₀/мл, для ВБТ4 и ВБТ16 составляли 6.75-7.0 lg ТЦД₅₀/мл, соответственно. После определения биологической активности вируса БТ проводили инактивацию 0.05 % бета-пропиолактоном в течение 12 час. согласно ранее проведенной методике [19]. После чего инактивированным вирусом вакцинировали животных внутримышечно, в объеме по 5 мл и выдерживали 30 сут. Затем у них брали кровь для приготовления сыворотки и проводили контрольное заражение по $10^{4.0}$ ИД_{50/мл} гомологичными штаммами. За подопытными животными наблюдали в течение 14 сут. Результаты этих исследований сведены в табл. 3.7.

Наблюдения показали, что все изучаемые штаммы вызывают у овец образование иммунитета, который обеспечивают устойчивость их к заражению гомологичным вирусом. Лишь только на контрольное заражение

эпизоотического штамма Gil-Gil животные реагировали незначительным повышением температуры тела.

Таблица 3.7 – Иммуногенные свойства некоторых штаммов ВБТ

Наименование штаммов	Количество животных		Титр ВНА, \log_2	Клиническая реакция, в баллах
	Заражено	Реагировало		
«874»	3	1	1.2	8
«134»	3	2	1.5	9
Gil-Gil	3	3	1.0	15
ВБТ4	3	0	2.0	0
ВБТ16	3	0	2.2	0

Из данных табл. 3.7 видно, что в организме овец, вакцинированных инактивированными штаммами ВБТ4 и ВБТ16, вируснейтрализующие антитела обнаруживались в более высоких титрах (2.0-2.2 \log_2), чем в организме овец, привитых инактивированными штаммами «874», «134» и Gil-Gil.

Суммируя данные проведенных исследований, можно отметить, что среди рассматриваемых групп эпизоотических штаммов вируса БТ, штаммы ВБТ4 (Хуросон07/04) и ВБТ16 (и RT/RIBSP07/16) являются наиболее подходящими для приготовления инактивированной вакцины. Они совершенно апатогенны для овец, проявляют наибольшую активность к размножению в культурах клеток и, что очень важно, обладают достаточно высокой иммуногенной активностью, также они являются эпидемически актуальными для стран Центральной Азии, так как данные штаммы выделены в Таджикистане во время мониторинговых исследований в 2007 году.

3.3. Технология приготовления инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ

Определение ростовых свойств культур клеток в условиях суспензионного культивирования

Первым этапом наших исследований являлось определение способности роста культур клеток в суспензионных условиях. При проведении исследований на биореакторе БИОК-022с посевная концентрация клеток составляла не менее 400 тыс.кл/мл. При культивировании, через каждые 2 сут. в биореактор доливали ростовую среду в объёме 500-1000 мл [196]. Результаты экспериментов представлены в табл. 3.8.

Таблица 3.8 – Ростовые свойства культур клеток ВНК-21 и EL-4 при суспензионном культивировании

Питательная среда	Линия клеток	Исходная концентрация клеток, тыс./мл	Количество полученных клеток, тыс./мл ($\bar{X} \pm m$), n=4			
			1-сут.	2-сут.	3-сут.	4-сут.
ПСС	ВНК-21	456 \pm 6	742 \pm 5	1285 \pm 12	1425 \pm 15	812 \pm 15
RPMI-1640	EL-4	400 \pm 12	812 \pm 0,12	1448 \pm 0,4	3230 \pm 0,2	4386 \pm 0,8

Проведённые исследования показали, что динамика накопления клеток при использовании клона ВНК-21 достигает пика на 3-е сут., а при использовании клона EL-4 – на 4 сут., далее отмечается остановка роста клеток и снижение числа жизнеспособных клеток. Таким образом, опытным путём установлено, что оба клона пригодны для культивирования в суспензионных условиях [196]. Однако, на следующем этапе необходимо изучить чувствительность клеток к ВБТ и соответственно, выход активной биомассы.

Культивирование ВБГ в культурах клеток ВНК-21 и EL-4 в суспензионных условиях

Развитие специфической профилактики инфекционных заболеваний человека и животных создало необходимость разработки методов получения вирусного сырья. В связи с этим актуальным является совершенствование технологии получения вирусного материала для разработки высокоэффективных диагностических и вакцинных препаратов.

На сегодняшний день в литературных источниках достаточно подробно освещены вопросы культивирования ВБГ в различных биологических системах, в том числе и в клеточных [129, 196]. Так, ВБГ успешно культивируется в перевиваемых культурах клеток ПС, Vero, ВНК-21 и EL-4 др. [125-131, 164, 196]. Также хорошо изучены стационарные и роллерные способы культивирования ВБГ в культуре клеток, однако более продуктивным для крупномасштабной наработки вирусного материала при приготовлении вакцин является суспензионный метод культивирования. Данный метод имеет ряд преимуществ, к которым относятся масштабируемость, возможность получения большого объема биологического материала за один цикл; стандартные условия выращивания клеток и вирусов; постоянный контроль и калибровка условий культивирования, рентабельность метода и др. [165-167, 196]. В связи с этим представляется актуальным получение высокоактивного вирусного сырья в перевиваемых культурах клеток ВНК-21 и EL-4, оптимизация биотехнологических параметров суспензионного культивирования ВБГ, изучение и стабилизация его биологической и антигенной активности в процессе непрерывного суспензионного культивирования [196].

При определении условий культивирования ВБГ в вихревом биореакторе изучали скорость перемешивания, концентрацию клеток и длительность культивирования вируса. Дальнейшее инкубирование инфицированных культур клеток проводили в соответствии с п.п. 2.2.4. Во

время эксперимента рН-среды колебались в пределах 6,9 до 7,4. Перемешивание среды проводили при 35 – 40 об/мин. Концентрация клеток варьировала в зависимости от использованной культуры от 1,5 (ВНК-21) до 3,6 млн. кл/мл (EL-4) при длительности культивирования от 3 до 6 сут., при этом ежедневно отбирали пробы для определения уровня накопления вируса в пассажных уровнях. Результаты этих опытов представлены в табл. 3.9.

Таблица 3.9 – Активность ВБТ , выращенных в культурах клеток EL-4 и ВНК-21 при культивировании в биореакторе БИОК-022с

Пассажный уровень	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /мл (X±m), n=3				p-значение
	EL-4		ВНК-21		
	4-серотип	16-серотип	4-серотип	16-серотип	
1	4,12±0,07	4,25±0,08	6,75±0,10	6,81±0,16	<0.0001
2	6,58±0,22	6,81±0,12	6,33±0,22	6,55±0,12	0.02
3	6,16±0,22	6,75±0,07	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
4	5,83±0,08	5,91±0,16	7,75±0,10	7,25±0,11	<0.0001
5	4,91±0,16	5,12±0,13	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
6	4,83±0,08	5,25±0,11	7,66±0,08	7,25±0,11	<0.0001

В результате проведенных опытов по культивированию ВБТ в исследуемых суспензионных линиях клеток установлены, высокие пролеферативные свойства клеток с высокой репродукцией вирусной массы начиная с первого пассажа. При этом более высокие титры вируса накапливались в культуре клеток ВНК-21. При этом титр вируса в зависимости от культуры клеток имеет существенную разницу ($p < 0.0001$) [196].

В дальнейших экспериментах по определению стабильности уровня накопления ВБТ при пассировании установлено, что по мере увеличения

количества пассажей вируса в клетках EL-4, титр вируса с каждым пассажем существенно снижается ($p < 0.0001$) [196].

В доступных литературных источниках при поиске информации, касающейся чувствительности культуры клеток EL-4 по отношению к другим вирусам, в том числе к ВБТ не обнаружено, за исключением единичных данных по вирусу бешенства [186, 196]. Указывалось, что крупномасштабного выращивания вируса бешенства в культуре клеток EL-4 не проводилось, и эти исследования остались на уровне лабораторного эксперимента.

Известно что, в настоящее время в производстве биологических препаратов используют культуру клеток ВНК-21 в качестве субстрата для репродукции вирусов ящура и бешенства в суспензионных условиях. В доступной литературе мало информации по адаптации к суспензионному способу выращивания ВБТ в культуре клеток ВНК-21 и использовании ее в производстве вакцин против данной болезни. Только, в одной научной статье представлены результаты крупномасштабного культивирования ВБТ в культуре клеток ВНК-21, выращенных на микроносителях [187, 196]. Данный способ на микроносителях заключается в культивировании клеток при их постоянном перемешивании, что является близким аналогом суспензионного метода культивирования.

Однако указанный метод имеет существенные недостатки, к которым относятся: использование дополнительных дорогостоящих микросфер, которые в свою очередь имеют ограничения в поверхности, дополнительные трудности при их перемешивании в связи с их массой они постоянно оседают на дно сосудов и слипаются, что в конце приводит к удорожанию стоимости получаемой вирусной биомассы [196].

Биологические препараты, полученные на перевиваемых клеточных линиях, не всегда являются безопасными. Согласно существовавшему мнению, использование перевиваемых клеток для получения вирусов в

производстве вакцин может быть причиной их онкогенности [123, 196] из-за присутствия в вакцине посторонних агентов. Прежде всего, это было связано с клетками ВНК-21 и противоящурной вакциной. По литературным данным онкогенность клеток ВНК-21 для лабораторных и домашних животных хорошо изучена, и установлено, что у животных (КРС, овцы, свиньи, крысы, кролики, морские свинки и мыши) клетки ВНК-21 не вызывают образование опухолей. Постоянный технический комитет экспертов Европейской комиссии по борьбе с ящуром FAO рекомендовал клетки ВНК-21 для изготовления вакцины, признав их безопасными для сельскохозяйственных животных. Онкогенность культуры клеток EL-4 в доступной литературе нами не обнаружена, и использование данной культуры клеток в производстве вакцинных препаратов остается открытым и требует дополнительных исследований. Поэтому культура клеток ВНК-21 на сегодняшний день является актуальной для суспензионного культивирования ВБТ [196].

Таким образом, при сравнительных исследованиях масштабного культивирования ВБТ в культурах клеток ВНК-21 и EL-4 установлено, что вирус накапливается в более высоких титрах в культуре клеток ВНК-21, таким образом, в дальнейших исследованиях использовали вышеуказанную суспензионную линию клеток.

Отработка параметров крупномасштабного культивирования ВБТ суспензионным методом

Массовое выращивание культуры клеток и вирусов является главным звеном биотехнологического цикла. Получение сотен и даже сотен тысяч литров культурального вируса в год зависит от вида вакцин и масштаба их применения. Ежегодно производство инактивированных вакцин, связанное с получением сотен литров культуральной вирусной биомассы с использованием стационарного или роллерного методов выращивания не удовлетворяет крупномасштабное производство таких вирусных вакцин.

Кроме этого, на выход и качество вируса при этом могут влиять среда, количество клеток, температура культивирования, метод заражения, а также другие параметры культивирования. Поэтому, исследовательская работа, связанная с отработкой параметров культивирования ВБТ ранее проведённая Е.О. Абдураимовым [19, 196] подходят для стационарного и роллерного методов и эти параметры культивирования ограничивались только лабораторными условиями. В связи с этим перед нами была поставлена конкретная задача по отработке параметров крупномасштабного выращивания ВБТ суспензионным методом.

Для репродукции ВБТ использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21, выращенную по общепринятой методике в суспензии в биореакторе фирмы Biotron объёмом 30 л.

В ходе экспериментов были определены пролиферативные свойства используемой линии клеток, инфицированной ВБТ, а также незаражённых клеток ВНК-21. Результаты исследований представлены на рис.3.14.

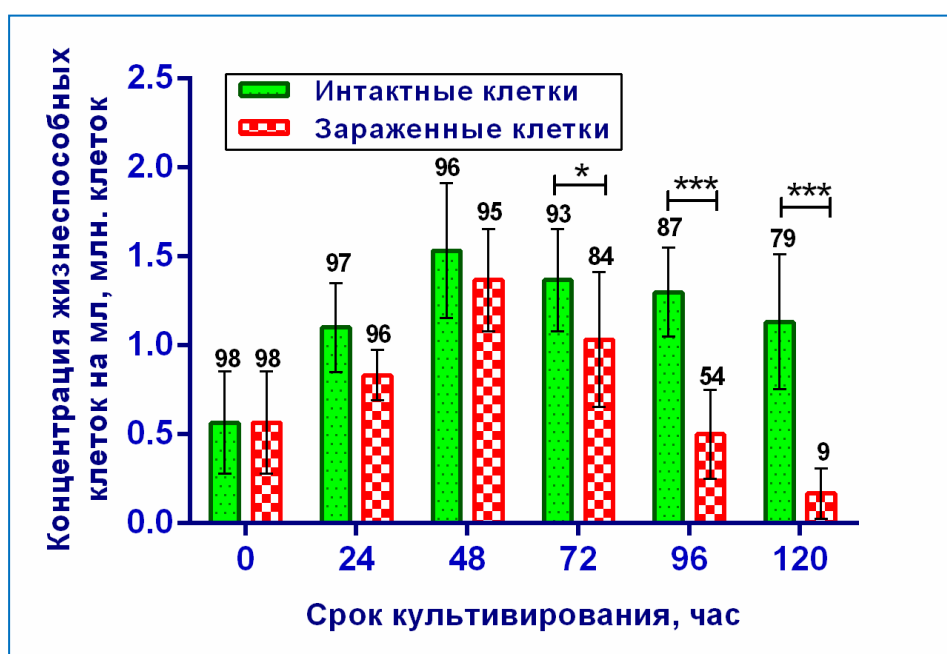


Рис. 3.14. Культивирование заражённых и интактных клеток ВНК-21 суспензионным методом. В верхней части столбцов указан процент жизнеспособных клеток от общего числа клеток в суспензии.

Из данных рис. 3.14 следует, что через 24 – 48 час. после заражения наблюдалась наибольшая пролиферативная активность клеток. Концентрация жизнеспособных клеток в заражённой и интактной культуре ВНК-21 составляла 1,45 и 1,5 млн. клеток на мл, соответственно. Индекс пролиферации в данный период составил 2,5. При последующем культивировании отмечали снижение количества жизнеспособных клеток в суспензии и параллельное увеличение доли мёртвых клеток. По истечению 72 – 96 час. в инфицированных клетках процент жизнеспособных клеток составил 54 – 84 %. При достижении уровня 90 % мёртвых клеток, культивирование останавливали. Указанный уровень достигнут на 5 сут. культивирования для заражённой культуры клеток, тогда как для интактной культуры клеток составил 8 сут.

В следующей серии опытов выясняли репродукцию вируса в зависимости от инфицирующей дозы и продолжительности культивирования. С этой целью культуру клеток ВНК-21 инфицировали ВБТ с множественностью 0,1; 0,2 и 1,0 ТЦД₅₀/кл. Результаты исследований представлены в табл. 3.10.

Таблица 3.10 – Изучение влияния доза заражения и сроков культивирования на уровень накопления ВБГ в культуральных суспензиях

Метод культивирования	Доза вируса, ТЦД ₅₀ /кл	Пассажный уровень	Титр вируса Ig ТЦД ₅₀ /мл (X±m) в зависимости от срока культивирования, сут				
			4	5	6	7	8
Суспензионный	0,1	1	5,92±0,08	5,83±0,22	6,75±0,25	6,33±0,14	5,00±0,14
		2	6,00±0,14	5,92±0,17	6,58±0,08	6,25±0,14	4,92±0,22
		3	6,08±0,22	6,00±0,25	6,67±0,08	5,33±0,17	5,00±0,29
	0,2	1	6,67±0,22	7,75±0,14	6,33±0,22	6,92±0,08	6,08±0,08
		2	6,83±0,08	7,75±0,25	7,33±0,08	6,83±0,08	6,00±0,14
		3	6,00±0,14	7,83±0,08	7,42±0,17	6,92±0,17	6,00±0,25
	1,0	1	6,33±0,17	5,25±0,00	5,08±0,08	4,83±0,22	4,50±0,29
		2	6,25±0,14	5,17±0,08	4,92±0,08	4,83±0,17	4,33±0,33
		3	5,42±0,08	5,42±0,08	5,00±0,14	4,67±0,17	4,25±0,25

Данные табл. 3.10 показывают, что при минимальной дозе заражения 0,1, ТЦД₅₀/кл процесс культивирования был продолжительнее на 1 - 2 сут. (до 6 - 7 сут.), чем при инокуляции 0,2 ТЦД₅₀/кл (4 - 5 сут). Наибольшее накопление титра вируса отмечено при дозе заражения 0,2 ТЦД₅₀/кл на 4 - 6 сут. культивирования - 6,00 ÷ 7,83 lg ТЦД₅₀/мл. Повышенные дозы заражения 1,0 ТЦД₅₀/кл не приводили к повышенному накоплению титра вируса в культуральных суспензиях. Также при заражении культуры клеток в дозе 0,2 ТЦД₅₀/кл титры биологической активности вируса в вирусной биомассе имели максимальные показатели и были статистически выше ($P < 0,05$) таковых, чем при заражении остальными дозами (0.1 или 1.0 ТЦД₅₀/кл).

Согласно литературным данным для других вакцинных штаммов ВБТ оптимальной дозой заражения являлись от 0,1 до 0,2 ТЦД₅₀/кл, что соответствует полученным результатам [130, 131, 164]. В связи с этим для последующих опытов использовали дозу заражения 0,1 ÷ 0,2 ТЦД₅₀/кл.

В следующей серии опытов изучали возможность накопления вируса в культуре клеток ВНК-21/17 в суспензионных условиях без смены и со сменой поддерживающей питательной среды. В связи с этим культуры клеток ВНК-21/17, выращенные в двух ферментёрах инфицировали вирусом в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. После чего, один ферментёр с культурой клеток оставили без смены питательной среды и продолжали инкубирование без остановки до достижения 90 % мёртвых клеток. Культуру клеток во втором ферментёре инкубировали со сменой среды. Для этого на 2 сутки после инфицирования биореактор остановили с целью осаждения клеток. Через час удалили три четверти верхней питательной среды, свежей питательной средой довели объем до исходного уровня. Далее продолжали инкубирование до достижения уровня 90 % мёртвых клеток. При культивировании вируса в суспензии клеток ВНК-21 контролировали содержание живых и мёртвых клеток, жизнеспособность которых оценивали после окраски метиленовой синью и подсчётом в камере Горяева. Результаты исследования представлены в табл. 3.11.

Таблица 3.11 – Влияние смены питательной среды на репродукцию ВБТ при суспензионном методе культивирования

Протокол	Время культивирования, час.	Доза вируса, ТЦД ₅₀ /кл	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл	Активность антигена, log ₂
Без смены питательной среды	96	0,1	5,6 ± 0,33	3,0
Со сменой питательной среды	120	0,1	7,25±0,14	5,0

Из данных табл. 3.11 видно, что при выращивании в суспензионных условиях смена питательной среды существенно влияет на репродукцию ВБТ. Так при культивировании без смены питательной среды вместе с сокращением срока культивирования на 1 сут, снизилась биологическая и антигенная активность вируса $5,6 \pm 0,33 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и 3 log_2 , по сравнению с суспензией со сменой питательной среды, активность которого составила $7,25 \pm 0,14 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и 5 log_2 соответственно.

Таким образом, для дальнейшего крупномасштабного культивирования ВБТ предполагается использовать методику со сменой питательной среды, так как это даст возможность для большего накопления антигена ВБТ.

В следующей серии опытов выясняли влияние концентрации водородных ионов (рН значения) поддерживающей среды на уровень накопления вируса. Серию опытов по подбору оптимальной величины рН питательной среды ПСС, провели при диапазонах от 6,9 до 7,7. Полученные результаты представлены в табл. 3.12.

Таблица 3.12 – Влияние рН поддерживающей среды на репродукцию ВБТ в культуре клеток ВНК21/17 в суспензионных условиях культивирования

рН среды	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл	Активность антигена в ИФА
6,9- 7,1	5,67±0,08	1:16
7,2-7,4	7,33±0,08	1:64
7,5-7,7	6,42±0,08	1:32

Из данных табл. 3.12 видно, что наиболее активно вирус репродуцируется в культуре клеток ВНК-21/17 при значениях от 7,2 до 7,4. В то же время изменение рН среды в щелочную и нейтральную сторону приводит к снижению уровня накопления вируса. Данный результат согласуется с данными других авторов [125 - 131], которые показали, что резистентность ВБТ в щелочной среде значительно выше, чем в кислой.

Таким образом, для крупномасштабного выращивания ВБТ наиболее оптимальными рекомендуется рН среды в пределах 7,2-7,4, так как данные значения рН являются благоприятными для репродукции ВБТ.

Следующим этапом работы являлось изучение влияния концентрации сыворотки КРС в поддерживающей среде на уровень накопления вируса. Результаты исследований представлены в табл. 3.13.

Таблица 3.13 – Влияние процентного содержания сыворотки в поддерживающей среде на уровень накопления ВБ в культуре клеток ВНК – 21

Метод выращивания	Пассаж	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m) при использовании поддерживающей среды с % сыворотки КРС				
		0,0 %	1,0 %	2,0 %	5,0 %	10,0 %
Суспензионный	1	4,25 ± 0,25	5,58 ± 0,30	6,58 ± 0,08	7,67 ± 0,08	7,58 ± 0,22
	2	5,42 ± 0,17	5,67 ± 0,22	6,92 ± 0,08	7,67 ± 0,17	7,67 ± 0,17
	3	5,33 ± 0,08	5,58 ± 0,22	6,00 ± 0,14	7,75 ± 0,14	6,58 ± 0,08

Как видно из табл. 3.12, титр вируса в полученных при культивировании в безсывороточной среде был в среднем на 0,5-1,0 lg ТЦД₅₀/мл ниже, чем при культивировании вируса с использованием сред содержащих сыворотку КРС вне зависимости от метода культивирования. Увеличение содержания инактивированной сыворотки КРС в поддерживающей среде до 5,0 - 10,0 % при культивировании приводило к более высокому накоплению вируса по сравнению с культивированием в питательной среде с 1,0 и 2,0 % содержанием сыворотки КРС. Значимых отличий в титрах вирусосодержащих суспензий при культивировании ВБТ с использованием различного содержания сыворотки КРС в составе поддерживающей среды не отмечено. По данным литературы ВБТ успешно культивируется с использованием, как мало сывороточных сред, так и сред, содержащих 5,0 %, 10,0 % сыворотки КРС [19, 24, 25, 129, 130, 131].

Таким образом, в дальнейших экспериментах использовали поддерживающую среду с содержанием сыворотки КРС – 5,0 %, позволяющую получать сравнительно высокие титры вируса и исключать перерасход сыворотки и её цитотоксическое воздействие на культуру клеток ВНК-21.

В следующей серии опытов проводили наработку вирусной биомассы на основе отработанных параметров крупномасштабного культивирования ВБТ. Так как во многих случаях воспроизводимость результатов лабораторного исследования не совпадает с данными при проведении работ в промышленных масштабах. В связи с этим нами были проведены работы по наработке 3 опытных серий вирусной суспензии на основе отработанных параметров крупномасштабного выращивания. При этом объем наработанных материалов составлял по 30 л в каждой серии в одном технологическом цикле. Подробные результаты исследований биологической и антигенной активности серий вирусных суспензий, по истечении 120 час. культивирования представлены на рис. 3.15, свидетельствуют о репродукции вируса в суспензионной культуре клеток. Антигенная и биологическая

активность вирусной суспензии через 120 ч составила 4 - 5 \log_2 и 7,50 – 7,75 \lg ТЦД₅₀/мл, соответственно.

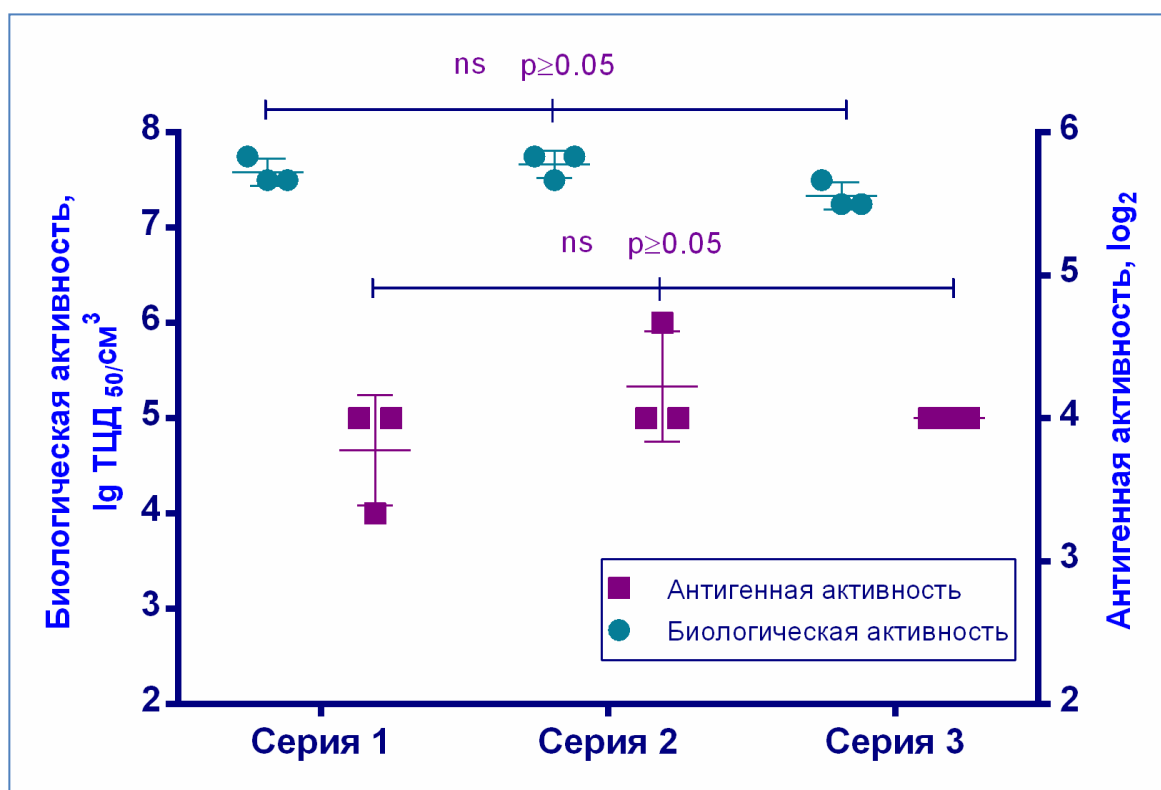


Рис.3.15. Результаты определения инфекционной и антигенной активности вирусных суспензий

Из данных рис. 3.15 видно, что показатели биологической и антигенной активности вируса между сериями, при культивировании по разработанному регламенту, не имеют существенных различий между собой ($P \geq 0,05$). Во всех случаях титры активности вируса были не менее 7,0 \lg ТЦД₅₀/мл и 4 \log_2 (1:32), соответственно. Следует отметить, что при проведении корреляционного анализа, выявлена средняя степень зависимости ($r=0,24$), между инфекционной и антигенной активностью в пробах вирусных суспензий.

Учитывая сроки снижения жизнеспособности клеток и отсутствия пролиферативной активности зараженной культуры ВНК-21, зафиксированные через 72 – 96 час., а также максимальное накопление в

суспензии клеток инфекционной и антигенной активности, регистрируемое к 120 час., следует заключить, что оптимальным периодом культивирования ВБТ является 120 час.

В результате проведенных исследований определен клеточный субстрат (ВНК-21), а также установлены оптимальные параметры культивирования ВБТ (доза заражения от 0,1 до 0,2 ТЦД₅₀/кл, содержание сыворотки крови КРС - 5% в поддерживающей питательной среде, инкубирование при температуре 37 °С в течение 120 час.), позволяющие получать вирусодержащую суспензию с биологической активностью 7,50÷7,75 lgТЦД₅₀/мл.

Таким образом, на основе данных экспериментов, разработан технологический регламент крупномасштабного культивирования ВБТ в культуре клеток ВНК-21, включающий следующие параметры:

- концентрация сыворотки в поддерживающей среде 5%;
- заражающая доза вируса в пределах от 0,1 до 0,2 ТЦД₅₀/кл;
- температура культивирования 36,5±0,5 °С;
- продолжительность культивирования 120 час.

Соблюдение указанных параметров крупномасштабного культивирования позволяет наработать высокоактивный вирусодержащий материал, пригодный для изготовления диагностических и профилактических препаратов.

Совершенствование режима инаktivации ВБТ бета-пропиолактоном и получение эмульгированных образцов с использованием масляных адьювантов, изготовление экспериментальных вакцин против БТ

В производстве инаktivированных вакцин, в том числе против БТ, наиболее широко применяются формальдегид, димерэтиленимин (ДЭИ) и бета-пропиолактон (БПЛ). В сравнительном аспекте, по результатам ранее проведённых исследований среди указанных химических веществ, более

щадящим инактивантом для ВБТ оказался БПЛ [19, 197]. Однако исследование ограничивалось всего лишь выбором инактиванта и определением отдельных параметров инаktivации [197].

В связи с этим целью нашей работы являлось усовершенствование режима инаktivации вируса БПЛ, изучение влияния концентрации инаktivанта, рН реакционной среды, температуры, продолжительности процесса инаktivации и влияние данных параметров на антигенные свойства вируса.

Инаktivация ВБТ в конечных концентрациях 0,05, 0,1 и 0,2% БПЛ при разных температурных режимах

В эксперименте использовали вирусосодержащую суспензию (ВСС) штамма «RT-RIBSP 07/16» ВБТ, наработанную в культуре клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) с инфекционной активностью $6,75 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и антигенной активностью 1:64 [197].

При инаktivации вируса БПЛ применяли разные температурные режимы согласно методике (см. п.2.2.6). Результаты исследований оценивали по кривым инаktivации, представленным на рис. 3.16, 3.17 и 3.18.

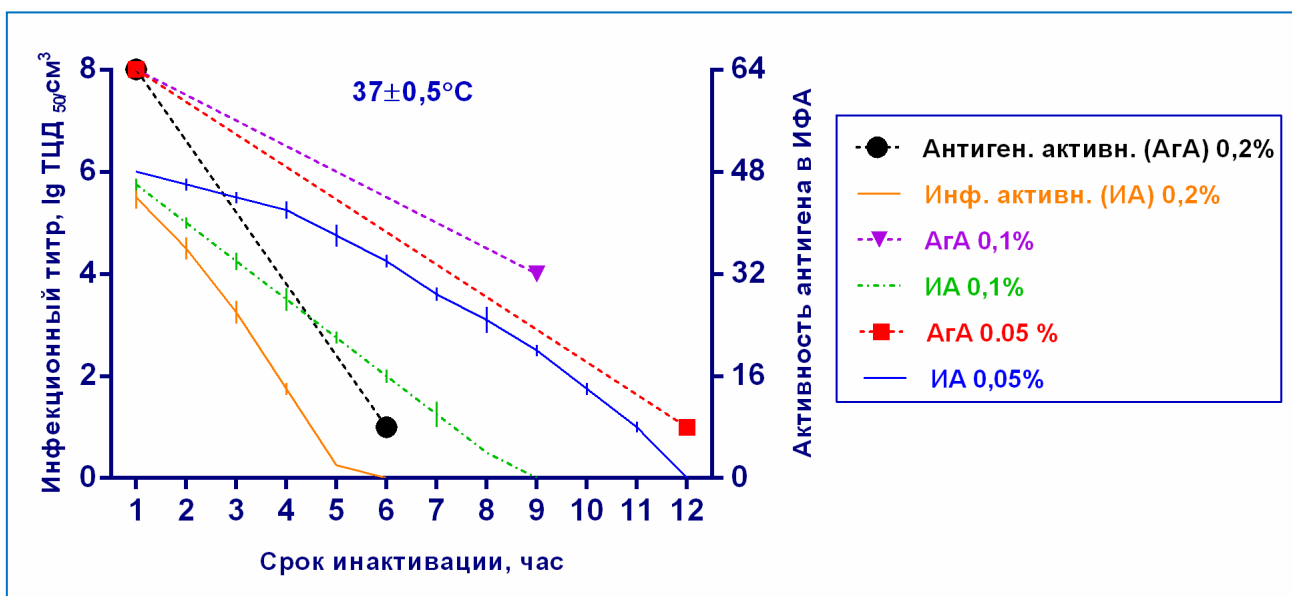


Рис.3.16. Кинетика инаktivации ВБТ при температуре 37±0,5 °C

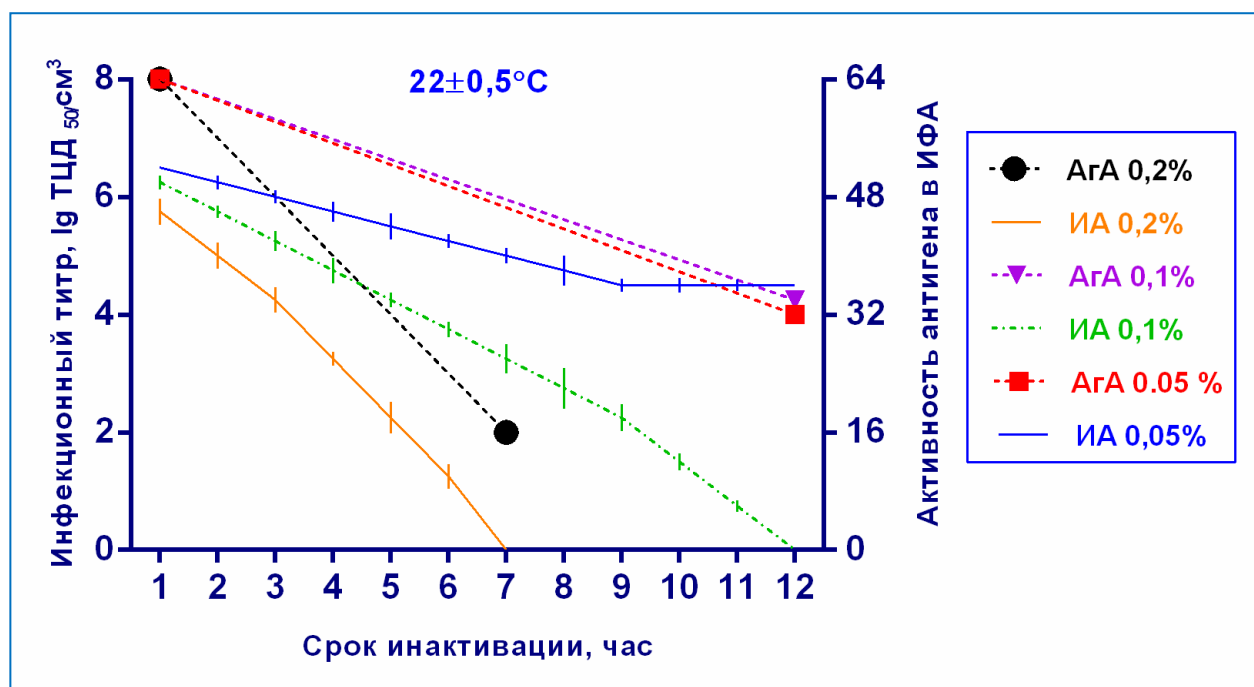


Рис.3.17. Кинетика инактивации ВБТ при температуре 22±0,5 °С

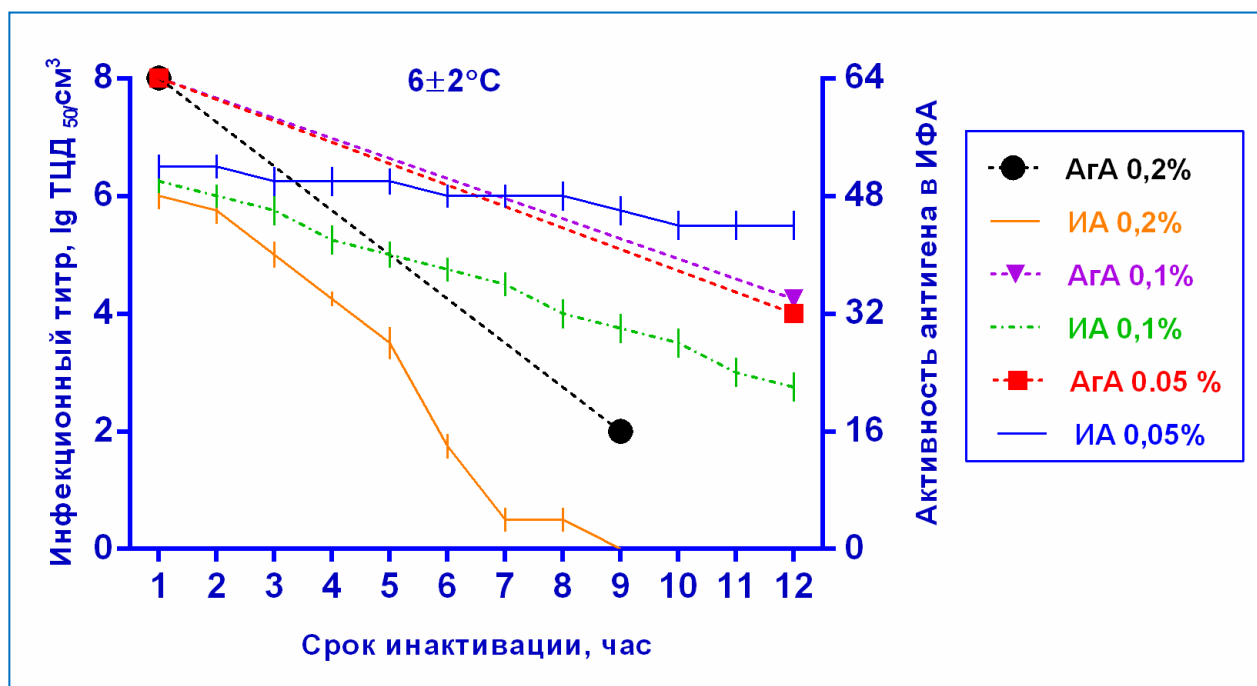


Рис.3.18. Кинетика инактивации ВБТ при температуре 6±2 °С

На рис. 3.16, 3.17 и 3.18 отмечено, что максимальная потеря инфекционного титра вируса при инактивации БПЛ в конечной концентрации 0,2 % и температурах 6±2⁰ С, 22±0,5⁰ С и 37±0,5 °С начинается

на 9, 7, и 6 час., соответственно. При концентрации инактиванта 0,1% вирус теряет инфекционную активность через 9 час., снижение концентрации БПЛ до 0,05 % и температура $37\pm 0,5$ °С увеличивают время, необходимое для инактивации вируса время до 12 ч (рис. 3.16) [197].

На рис.3.17 в виде кривой линии изображена скорость инактивации ВБТ БПЛ при температуре $22\pm 0,5$ °С. Как видно из рисунка, при воздействии 0,1 % концентрации инактиванта в течение 12 час. происходит полная инактивация инфекционной активности ВБТ, а при 0,05 % концентрации БПЛ за 12 час. инфекционная активность вируса снижалась на 1,50 lg ТЦД₅₀/мл. Опыты показали, что обработка вируса БПЛ в указанной концентрации не приводит к дальнейшему снижению его инфекционной активности [197].

На рис.3.18 графически изображена динамика инактивации ВБТ БПЛ при температуре 6 ± 2 °С. Как видно из рисунка, при концентрациях 0,05 % и 0,1 % активность вируса за 12 час. снижается на 1,50 lg ТЦД₅₀/мл и 3,0 lg ТЦД₅₀/мл, соответственно. Увеличение продолжительности обработки вируса в указанных концентрациях не приводит к дальнейшему снижению его активности [197].

Инфекционная активность вируса в контроле (без инактиванта) в течение 12 час. инкубирования при температуре $37\pm 0,5$ ° С снизилась на $0,25\pm 0,01$ lg ТЦД₅₀/мл, при температурах 6 ± 2 ° С и $22\pm 0,5$ ° С титр вируса оставался на исходных уровнях [197].

Антигенная активность вируса при инактивации БПЛ в конечной концентрации 0,1 % вне зависимости от температурных условий сохранилась максимально в течение всего срока наблюдения. При минимальной (0,05 %) и высокой концентрации БПЛ (0,2 %), при всех испытанных температурных режимах антигенная активность вируса снижалась на 2-3 порядка. Антигенная активность вируса в контрольных пробах в процессе всего периода инактивации оставалась на исходном уровне [197].

Аналогичные исследования были проведены Т.Хлыбовой с соавторами в 1970 годы [139, 197]. Результаты этих исследований показали, что при концентрации БПЛ 0,2 % при 4 °С вирус инактивируется в течение 24 час., повышение концентрации до 0,4 % приводит к потере инфекционности за 8 час. При проведении аналогичных исследований при температуре 37 °С было установлено, что при 0,2 % инаktivация происходит за 4 час., при 0,4 % за 1 час. [139, 197]. При этом было определено, что в результате воздействия температуры 37 °С инаktivация вируса проходила быстрее, чем при 4 °С.

Анализируя приведённые выше результаты исследований, можно отметить, что БПЛ в концентрации 0,1% при температуре $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в течение 9 час. полностью разрушает инфекционные свойства ВБТ, сохраняя при этом его антигенную активность. Отработанные вышеизложенные параметры инаktivации вируса блутанга БПЛ не являются окончательными для получения высокоактивного инаktivированного материала. С этой целью в дальнейших экспериментах нами были проведены исследования по подбору рН реакционной среды, способствующей получению инаktivированного ВБТ с более высокой антигенной активностью.

Инаktivация вируса БПЛ при разных значениях рН реакционной среды

В ходе проведенного исследования было установлено, что инаktivация вируса БПЛ достигается в концентрации 0,1 % при температуре $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Однако при рН (6,5-6,9) снижение антигенной активности вируса проходит быстрее и к 12 час. активность антигена составляла 1:4 (см. рис.3.19) [197].

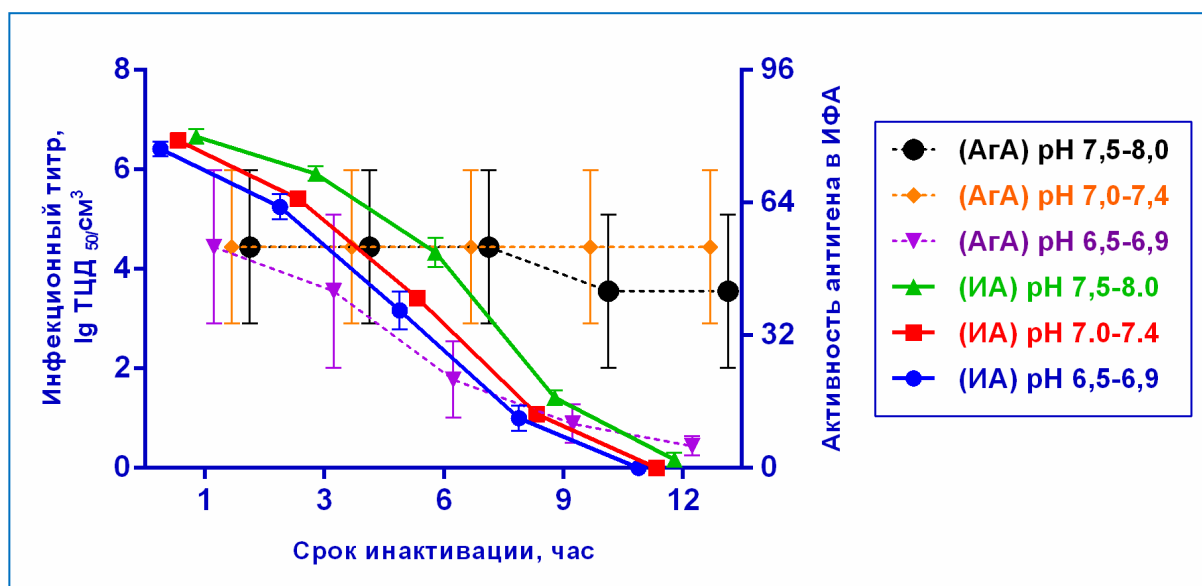


Рис.3.19. Кинетика инактивации вируса БПЛ в концентрации 0,1 % при разных значениях pH реакционной среды

При значении pH 7,5-8,0 антигенная активность вируса снизилась на 1 порядок, и составила 1:32. Наиболее продолжительный процесс инактивации наблюдается при значении pH 7,0 –7,4. При этом антигенная активность вируса оставалась на исходном уровне в течение всего срока инактивации (см. рис.3.19).

Селиверстов и др. [188] провели исследования по изучению влияния pH среды на инфекционную активность вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «К-58» при инактивации аминоэтилэтиленимином и БПЛ в различных концентрациях и различных pH. В результате установлено, что инактивация вируса инфекционной бурсальной болезни эффективнее протекает при значениях инактивантов, близких нейтральной (pH 7,0) [197].

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, однако при инактивации других вирусов необходимо учитывать их биологические особенности, а также устойчивость к физическим и химическим факторам, так как вирус блутанга репродуцируется и сохраняет свою инфекционную и антигенную активность при pH 7,0-7,5 [178]. Низкие значения pH можно использовать для инактивации тех вирусов, которые

более устойчивы в данных условиях. Данный метод эффективен в отношении вирусов с оболочкой (капсидом), для других вирусов, его возможно совмещать с повышением температуры [197].

Таким образом, при использовании инактиванта со значениями рН 7,0-7,4, инаktivация ВБТ происходит в щадящем режиме, что подтверждено сохранением антигенной активности инаktivированной суспензии. Совокупность проведенных сравнительных исследований позволили с уверенностью заключить, что БПЛ является более эффективным и щадящим инаktivантом по сравнению с другими инаktivантами, так как обеспечивает не только полную и необратимую инаktivацию вируса, но и максимальную сохранность его антигенных свойств. Также разработанный нами технологический регламент по инаktivации вируса блутанга БПЛ воспроизведен в более чем 10-ти лабораторных и 5 производственных масштабах. Полученные данные послужили основой использования БПЛ в дальнейших исследованиях.

Проверка полноты инаktivации ВБТ

Полноту инаktivации ВБТ определяли с использованием метода последовательных пассажей в биосистемах (культура клеток и 3-5 дневные мышата-сосуны; см. п.2.2.7). В результате проведенных экспериментов установлено отсутствие деструктивных изменений в монослое клеток и каких-либо клинических признаков болезни на мышатах-сосунах, все это подтверждает, что тестируемые пробы являются авирулентными.

Подбор и оценка иммуностимулирующей эффективности различных адьювантов для включения в состав инаktivированной вакцины

Существенную роль в повышении иммуногенности инаktivированных вакцин отводится адьювантам или иммуностимулирующим веществам. Правильный выбор адьюванта является важной задачей в разработке эффективных вакцин [123, 132, 179, 198]. Поэтому с целью подбора

адьювантов и изучение их эффективности нами были испытаны следующие адьюванты: гидроокись алюминия с сапонином (сорбированная вакцина) и новый коммерческий масляный адьювант Montanide™ ISA-71VG французской фирмы Seppic (эмульгированная вакцина).

Сорбированную (ГОА) и эмульгированную (ISA-71VG) вакцину приготовили согласно инструкции производителя. ГОА-вакцина была получена в виде коллоидной дисперсии, розоватого цвета. Эмульгированная вакцина получена в виде эмульсии белого цвета однородной консистенции. После приготовления двух типов вакцин измеряли значения их pH и вязкость эмульсии. Результаты представлены в табл. 3.14.

Таблица 3.14 – Физические параметры сорбированной и эмульгированной вакцины

Параметры	Состав препарата	
	ГОА с сапонином +Антиген	ISA-71VG+Антиген
pH	6,68±0,27	7,21±0,22
Вязкость (мм ² /с)	21,2±0,11	25,5±0,35

Из данных табл. 3.13 видно, что pH значение ГОА-вакцины составило в среднем 6,68±0,27, тогда как в эмульгированной вакцине pH показало в среднем 7,21±0,22. Вязкость сорбированной и эмульгированной вакцин составили 21,2±0,11 и 25,5±0,35 мм²/с, соответственно.

При этом следует отметить, что вакцины с адьювантами должны вводиться парентерально через шприцы и при этом вязкость имеет решающее значение. По данным Jain et al. [189, 198] установлено, что вязкость парентеральных препаратов может повлиять на проходимость через шприц. В результате проведенных нами исследований было установлено, что низкая вязкость препарата наблюдалась у ГОА адьюванта, что обеспечивает легкую проходимость через шприц. При этом эмульсия типа «вода в масле»

также легко проходила через шприц, хотя вязкость была выше, чем ГОА вакцины [198].

Главным недостатком инактивированных эмульгированных вакцин является нестабильность эмульсии в процессе хранения препарата, приводящая к снижению иммуногенности. По данным отдельных авторов [150, 190, 198] существует зависимость стабильности эмульсии от степени очистки вируссодержащей суспензии, входящей в состав препарата. Авторами отмечено, что даже частичное разрушение эмульсии, вследствие повышенного содержания балластных белков в инактивированной вакцине снижает антигенную активность препарата в 1,5-2 раза. В связи с этим для изучения стабильности эмульсии в препаратах определяли по методам, описанным ранее [150, 151, 198]. В результате проведенных исследований по центрифугированию и термостатированию показали, что при визуальном просмотре высота столбика масляной фракции составляла менее 10 % общей величины исследуемой эмульсии (рис. 3.20 и 3.21). Данный показатель является допустимым согласно паспорту производителя масла и соответствует данным других авторов [151, 198].

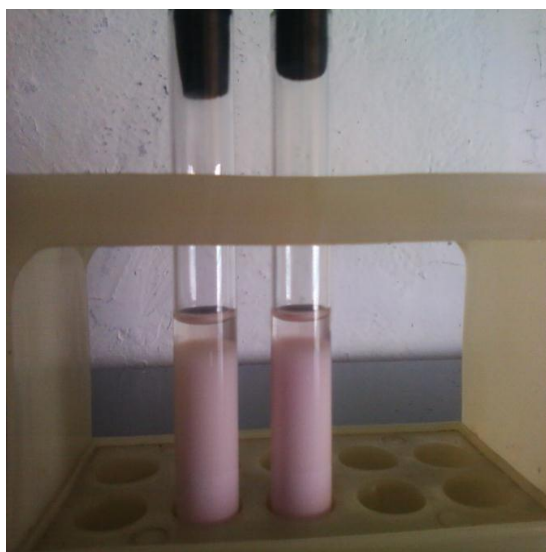


Рис. 3.20. Контроль стабильности эмульсии методом термостатирования



Рис. 3.21. Контроль стабильности эмульсии методом центрифугирования

В результате проведенных нами исследований установлено, что вакцина, приготовленная на основе масляного адьюванта с типом эмульсии «вода-масло» оказалась стабильной, хотя при составлении данной вакцины не проводили очистку антигена [198].

Большинство адьювантов вызывают нежелательные эффекты в месте инъекции, наиболее частым является воспалительный ответ [191, 198]. Тем не менее, среди более 100 различных соединений, описанных в литературе как адьюванты, большинство было слишком реактогенным для использования в области здравоохранения, так и в ветеринарии. Также, при использовании соли алюминия в вакцинах для человека существуют ограничения по содержанию алюминия. В европейских странах эти пределы составляют 1,25 мг/мл, а в США 0,85 мг/мл. В ветеринарных вакцинах нет такого определенного предела для допустимого содержания адьювантов соли алюминия. Хотя, Valtulini сообщил, что до 12 мг Al в вакцинах хорошо переносится у свиней, тогда как вакцинные препараты, содержащие 40 мг, индуцируют гранулемы [192, 198].

Поэтому, при изучении реактогенности учитывали реакцию привитых животных на введение вакцины, общее состояние животных, в том числе местную реакцию. Местную реакцию оценивали визуально на наличие воспаления в месте инъекции, и каких либо других изменений. Общее клиническое состояние животных оценивали на основании ежедневного клинико-температурного контроля [198].

Установлено, что после введения вакцины с содержанием ГОА 10 мг/мл у привитых животных в местах инъекции отмечены уплотнения, которые постепенно рассасывались и исчезали в течение 7-10 сут. после вакцинации. Также у 90% животных данной группы наблюдалась лихорадка до 40,5 и 40,6°C в течение первых 2-3 сут (см. рис.3.22) и хромота за счет введения вакцины с данным адьювантом (гидроокись алюминия).

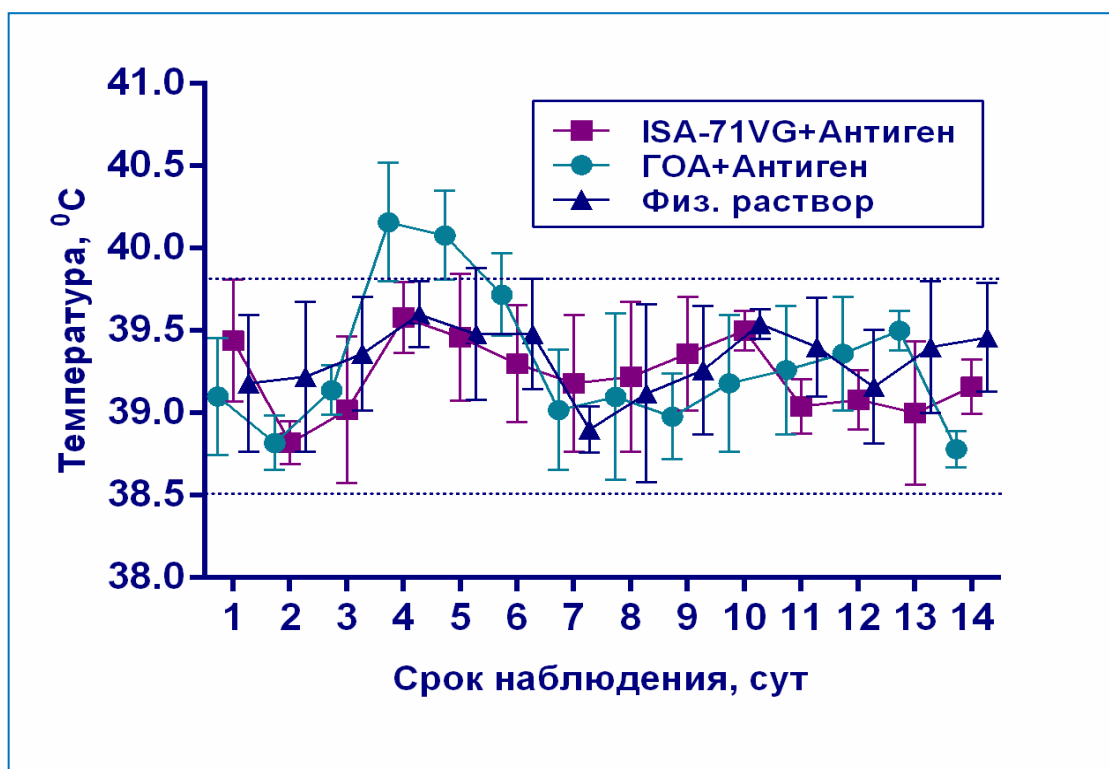


Рис.3.22. Температурная реакция животных привитых сорбированной и эмульгированной вакцинами

При изучении реактогенности эмульгированной вакцины установлено, что у животных после внутримышечного введения в объеме 2 мл в местах инъекции не отмечались какие-либо клинические изменения, при этом температура тела была в пределах физиологической нормы (см. рис.3.22). Клиническое состояние у животных оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода наблюдения [198].

В следующих опытах изучали иммуногенность приготовленных сорбированной и эмульгированной вакцин на овцах (n=5). Результаты динамики накопления антитела к структурному белку VP7 ВБТ представлены в табл. 3.15.

Таблица 3.15– Результаты динамики накопления антител к структурному белку VP7 у привитых овец

Вид вакцины	Номер животного	Титр антител в ТФ-ИФА, сут.					
		0	7	14	21	28	40
ISA-71VG + Антиген	131	-	-	1:400	1:800	1:800	1:6400
	369	-	-	1:400	1:800	1:800	1:6400
	367	-	-	1:400	1:800	1:1600	1:6400
	137	-	-	1:400	1:800	1:1600	1:6400
	296	-	1:100	1:200	1:800	1:1600	1:800
ГОО+Антиген	635	-	1:100	1:200	1:200	1:800	1:200
	378	-	-	1:200	1:200	1:800	1:200
	416	-	-	1:200	1:200	1:1600	1:200
	512	-	-	1:200	1:200	1:1600	1:200
	375	-	-	1:200	1:800	1:800	1:800
Примечание «-» - отсутствие антител в организме							

При вакцинации овец как сорбированной (ГОО+Антиген), так и эмульгированной (ISA-71VG + Антиген) образцами в организме у привитых животных на 7 сут. после вакцинации не отмечаются антитела к структурному белку VP7 вируса блутанга (см. табл. 3.15). Далее при изучении динамики формирования VP7-антител в сыворотках крови у вакцинированных овец на 14, 21 и 28 сут. после вакцинации наблюдались антитела в титрах от 1:200 до 1:1600 в ИФА. На 40 сут. после иммунизации у животных, привитых сорбированной вакциной, титр VP7-антител снижается, тогда как при иммунизации эмульгированной вакциной наблюдается существенное повышение титров антител до 1:6400. При этом в разный период времени (7, 14, 21 и 28 сут.) между средними титрами антител у животных, привитых сорбированной (ГОО+Антиген) и эмульгированной (ISA-71VG + Антиген) вакцинами, существенной разницы не отмечалось ($p > 0.05$). Тогда как на 40 сут.

значимая разница наблюдались между титрами антител двух групп животных, привитых данными вакцинами ($p < 0,001$) [198].

Очень важно изучение динамики формирования ВНА к ВБТ в РН, так как данная реакция является «золотым стандартом» при оценке иммуногенной активности вакцины. В связи с этим, у овец после вакцинации определяли накопление ВНА [198]. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 3.23.

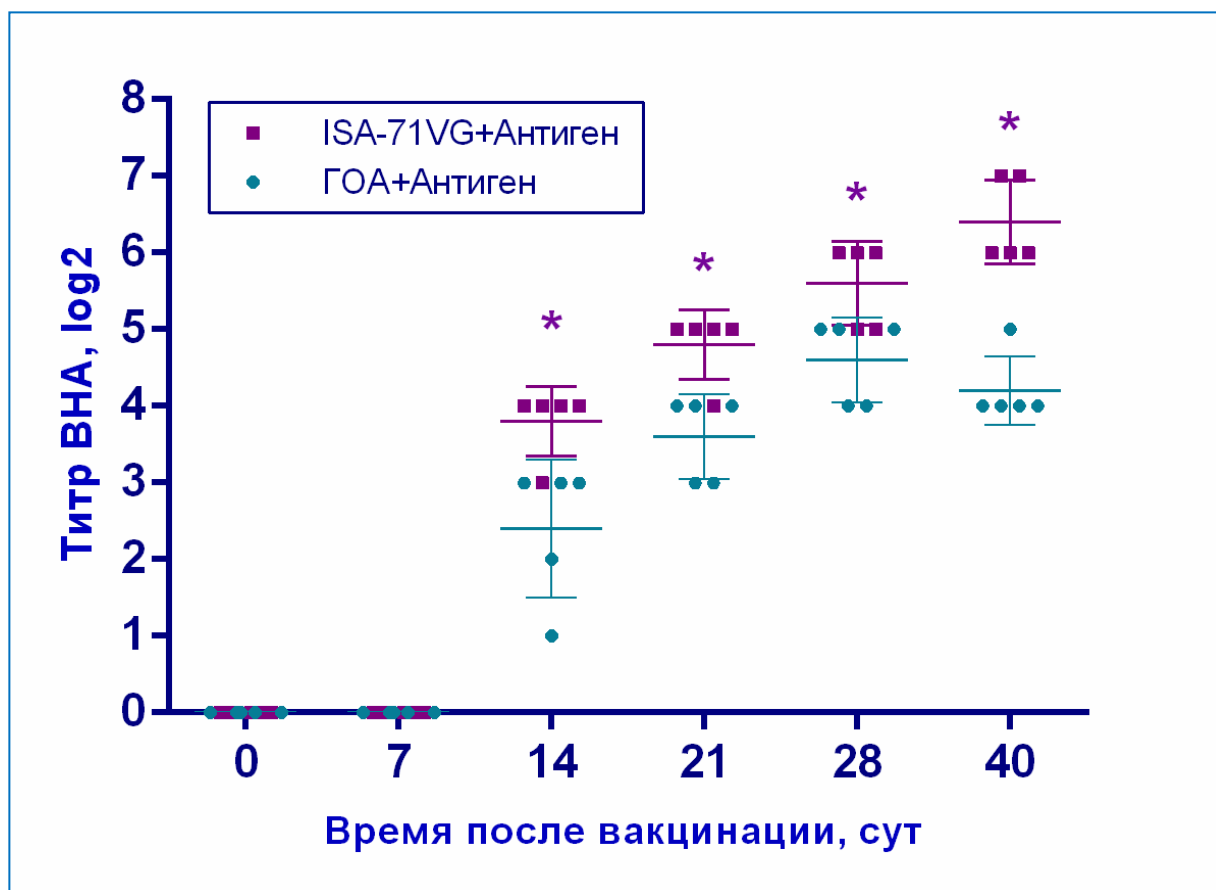


Рис. 3.23. Результаты исследования динамики формирования ВНА у вакцинированных животных. Значения приведены как средние титры антител \pm SD. Статистический анализ проведен с помощью t-теста. * - $p < 0.05$.

Результаты проведенных исследований показали, что ВНА у овец на 7 сут. после иммунизации не выявляются, тогда как на 14, 21, 28 и 40 сут. после иммунизации обнаружили ВНА в титрах 2,0 и 7,0 log₂, соответственно у всех овец независимо от типа использованных вакцин. Однако на 28 сут.

после иммунизации у животных, вакцинированных сорбированной вакциной, отмечено незначительное понижение титра ВНА. На 40 сут. после вакцинации, тогда как у животных иммунизированных эмульгированной вакциной, отмечалось повышение титра ВНА в среднем до $7,0 \log_2$. Следовательно, для приготовления инактивированной вакцины против БТ более эффективным адъювантом является Montanide ISA-71VG, так как адъювант не вызывает побочных реакций у вакцинированных животных, стимулирует образование вируснейтрализующих антител в более высоких титрах по сравнению с сорбированной вакциной [198].

Таким образом, при сравнительном изучении иммуностимулирующей эффективности и реактогенности тестируемых адъювантов, ввиду наилучших иммунобиологических показателей, был признан оптимальным и включен в состав вакцины новый коммерческий масляный адъювант Montanide™ ISA-71VG.

В заключение отметим, что полученные результаты этих исследований позволили нам перейти к более детальному изучению иммуногенных свойств, приготовленных по отработанному методу.

Приготовление и контроль качества опытных серий инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ

После того как была показана возможность приготовления достаточно иммуногенной вакцины против БТ, нами были проведены исследования по изучению влияния дозы, метода и повторного введения вакцины на выраженность иммунитета у МРС и КРС. Однако, прежде чем приступить к изучению этих вопросов, нами были приготовлены 3 экспериментально-лабораторные серии бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против ВБТ из 4 и 16 серотипов по разработанной технологии.

Составление бивалентной вакцины проведено согласно пункту 2.2.8. Контроль качества опытных серий бивалентной вакцины против БТ контролировали по следующим параметрам: стерильность (п.п. 2.2.9.1),

стабильность эмульсии (п.п. 2.2.9.2), вязкость (п.п. 2.2.9.3), полнота инактивации вируса (п.п. 2.2.7), определение концентрации водородных ионов (рН) препарата (п.п. 2.2.9.4), безопасность (п.п. 2.2.10), иммуногенная активность (п.п. 2.2.11). Суммарные результаты контроля качества приготовленных опытных серий вакцины представлены в табл. 3.16.

Результаты исследований, приведенные в табл. 3.16, показали, что все апробированные серии вакцины против БТ стерильны, авирулентны, безопасны, обладают стабильной эмульсией, допустимым уровнем вязкости и рН препарата.

Таблица 3.16 - Контроль качества экспериментальных серий инактивированной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБТ

№ серии препарата/ количество доз в серии	Стерильность	Стабильность	Вязкость, мм ² /с	рН вакцины	Остаточная вирулентность	Безопасность	Антигенная активность, log ₂
1 / 1000	да	да	28,2±0,1	7,1±0,01	-	+	7,3±0,7
2 / 2000	да	да	31,1±0,2	7,01±0,03	-	+	7,6±0,7
3 / 3000	да	да	29,1±0,2	7,2±0,01	-	+	7,8±0,4
<p>Примечания</p> <p>1 «+» вакцина безопасна, на месте ее введения присутствуют легкие поражения ткани;</p> <p>2 «-» авирулентна;</p>							

Таким образом, разработанный метод изготовления инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ позволяет готовить достаточно стерильные ареактогенные и иммуногенные препараты с хорошей воспроизводимостью. Данные этих исследований явились основанием для дальнейшего изучения их иммуногенности. Первоначально

определяли оптимальную иммунизирующую дозу инактивированной вакцины, обеспечивающую формирование у вакцинированных животных прочного иммунитета.

Изучение безопасности вакцины

После приготовления вакцины были проверены её безопасность на 5 овцах (см. табл. 3.17). Препараты вводили животным внутримышечно по 5 мл (5 доз/овец) с внутренней стороны бедра. В контрольной группе оставили не привитыми двух овец. За опытными животными вели ежедневное клиническое наблюдение, осматривая место аппликации и общее состояние с измерением температуры тела в течение 14 сут. Результаты исследований приготовленных опытных серий вакцины представлены в табл. 3.17.

Таблица 3.17 – Безопасность вакцины на овцах

Животные	Номер животных	Припухлость*	Температура	Стоматит	Диарея	Конъюнктивит	Носовое выделение	Саливация	Угнетение
Вакцинированная группа	1	+	+**	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	+***	-	-	-
Контрольная группа	6	+	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	+****	-	-	-

Примечания

1 (*) – у животных появились припухлости на месте введения препарата, которые рассасывались на 5-7 сут.

2 (***) – у одной овцы поднималась температура до 40.8 °С тела на 7 сут после введения вакцины.

3 (****) – у одной овцы в вакцинированной группе наблюдалась незначительная диарея на 4 сут после введения вакцины.

4 (*****) - у одной овцы в контрольной группе наблюдалась диарея на 3 сут.

5 (+) – положительная реакция.

6 (-) – отрицательная реакция.

По результатам проведенных исследований установлено, что у животных не наблюдались признаки отклонения от физиологической нормы кроме незначительного повышения температуры тела у 1/5 овцы до (40.8) °С на 7 сут. после введения вакцины в течение 2 сут. У 100% животных отмечены уплотнения в месте введения вакцины, которые постепенно рассасывались и исчезали в течение 5-7 суток после вакцинации (см. табл. 3.17). В единичных случаях у одного животного развивалась легкая диарея. Следует отметить, что и в контрольной группе животных, находившихся в том же помещении, также наблюдали подобные отклонения от нормального состояния, что, по-видимому, было связано с изменением режима кормления и условиями содержания.

По литературным данным при изучении безопасности инактивированных вакцин против ВТ на целевых животных уделяется внимание не только отсутствию клинических симптомов, характерных для блутанга, но и учитывают влияние вакцины на продуктивность животных [106]. В опытах на овцах при использовании разработанной нами бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины не выявлены проявления клинических симптомов болезни за исключением реакции на месте введения вакцины и незначительного краткосрочного повышения температуры животных, которое нормализовалось в течение 1-2 дней. Согласно данным литературы допускается образование инфильтрата на месте инъекции вакцины, без проявления побочных реакций, таких как повышение температуры тела, угнетение, исхудание и др. [191]. Вопросы, касающиеся влияния вакцины на продуктивность животных нами не изучались.

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что испытываемая инактивированная эмульгированная вакцина против блутанга с новым адъювантом Montanide® ISA-71VG безопасна для овец при внутримышечном введении в 5-кратной дозе (5 мл/овец).

3.4. Изучение иммуногенности инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины на МРС и КРС

Определение минимальной прививной дозы вакцины

Минимальную прививную дозу вакцины установили на основе определения 50 % иммунизирующей дозы вакцины (ИмД₅₀). Биологическая и антигенная активности 4 и 16 серотипов ВБТ, входящего в состав вакцины до инактивации составляли $7,66 \pm 0,12$ и $7,75 \pm 0,07$ lg ТЦД₅₀/мл и 1:64, соответственно.

ИмД₅₀ вакцины определяли на 3 мес. ягнятах согласно п.п. 2.2.12. Каждым указанным разведением привили по 6 гол. ягнят. Контрольное заражение вакцинированных и контрольных животных проводили согласно п.п. 2.2.11. на 30 сут. после прививки. Результаты определения ИмД₅₀ инактивированной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБТ приведены в табл. 3.18.

Таблица 3.18 – Определение ИмД₅₀ инактивированной вакцины ВБТ

Разведение вакцины	Контрольное заражение ягнят, гол.			Титр антител в РН, log ₂		ИмД ₅₀ , мл
	в опыте	иммунных	Реакция в баллах, в среднем по группе	ВБТ-4	ВБТ-16	
1:2	6	6	0±0,0	1,7±0,43	1,8±0,21	0,041
1:4	6	6	0±0,00	1,5±0,18	1,6±0,22	
1:16	6	3	5±2,1	1,1±0,22	1,3±0,21	
1:32	6	2	12±3,2	-	-	
Плацебо (контроль)	6	0	20±3,2	-	-	

Примечание «-» антитела в РН не обнаружены.

Из данных табл. 3.18 показано, что разведения вакцины с 1:2 до разведения 1:4 у всех вакцинированных овец ($n=6$) вызвала образование иммунного ответа с титрами от $(1,5 \pm 0,18)$ до $(1,8 \pm 0,21) \log_2$ в РН для обоих серотипов. Половина животных, в группе вакцинированных в разведении 1:16, заболели при контрольном заражении, хотя в организме животных присутствовали антитела в титре $(1,1 \pm 0,22)$ и $(1,3 \pm 0,21) \log_2$ для 4 и 16 серотипов, соответственно. Антитела у животных, привитых вакциной в разведении 1:32 отсутствовали, однако при их контрольном заражении 33,3 % этих животных, остались здоровыми и не проявляли клинических признаков болезни, в то время как в контрольной группе, все овцы заболели. При этом реакция контрольной группы составила в среднем 20 баллов.

Таким образом, минимальная иммунизирующая доза (ИмД₅₀) инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБТ составила 0,041 мл. Соответственно, испытанная прививная доза (1,0 мл) препарата содержит 24,4 ПД₅₀. Данная доза по протективности обеспечивала необходимый уровень эффективности вакцинации от контрольного заражения эпизоотическими штаммами в лабораторных условиях. Исходя из этого, в качестве оптимального прививного объема инактивированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов, нами была принята доза 1,0 мл, имеющая в запасе 24,4 ПД₅₀.

Изучение влияния метода введения инактивированной вакцины против БТ на эффективность иммунизации

Для определения влияния метода введения инактивированной вакцины на эффективность иммунизации животных прививали внутримышечно, подкожно и внутрикожно по 1,0 мл. Каждым методом вакцинировали по 4 овцы. Контролем служили невакцинированные овцы аналогичного возраста. Эффективность способов введения оценивали согласно п.2.2.11 на 30 сут. после иммунизации. Суммарные результаты этих опытов показаны в табл. 3.19.

Таблица 3.19 – Влияние метода введения инактивированной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБТ на эффективность иммунизации

Метод введения	Титр ВНА, log ₂		Реакция на контрольное заражение						Эффективность вакцинации, %
	ВБТ-4	ВБТ-16	Количество животных		Температура, °С	Другие признаки заболевания	Оценка в баллах		
			всего	реагирующих			максимальная	среднее по группе	
ВМ	2,3±0,33	2,1±0,31	4	0	-	-	0	0±0,0	100
ВК	1,2±0,43	1,3±0,50	4	2	40,5	+	2	0,7±0,41	50
ПК	1,9±0,38	1,8±0,27	4	0	40,3	-	0	0,2±0,27	100
Контроль	0,0	0,0	4	4	41,8	+	30	23±2,4	0
<p>Примечания</p> <p>1 ВМ – внутримышечно;</p> <p>2 ВК – внутрикожно;</p> <p>3 ПК – подкожно;</p> <p>4 « - » - отсутствие клинические признаки;</p> <p>5 « + » - наличие клинические признаки</p>									

Внутрикожная инъекция препарата в дозе 1,0 мл на 30 сут. после однократной вакцинации обеспечивает у 50% вакцинированных овец выработку антител в РН в титрах от $0,7 \pm 0,41 \log_2$. Тогда как внутримышечная и подкожная вакцинация обеспечивает у 100% подопытных выработку антител в РН в титрах от $(1,8 \pm 0,31)$ до $(2,3 \pm 0,33) \log_2$ для обоих серотипов (см. табл. 3.19).

Полученные результаты изучения титра ВНА между тремя испытанными методами введения показали неодинаковую динамику формирования гуморальных антител. Однако, при математической обработке данных, результаты не имели существенной разницы между испытанными методами инъекции ($p \geq 0.05$). Тем не менее, среди испытанных методов инокуляции, внутримышечное введение является наиболее эффективным по сравнению с другими методами. При этом методе вакцинации происходит более высокое накопление ВНА в организме привитых животных, и они проявляют большую устойчивость к контрольному заражению по сравнению с животными, привитыми внутрикожным и подкожным методами. Аналогичные результаты получены Е.О. Абдураимовым [19] при сравнении различных методов иммунизации инактивированной сорбированной вакциной против катаральной лихорадки овец.

Результаты этих исследований позволили приступить к проведению экспериментов по определению влияния повторности вакцинации (ревакцинация) и интервалы между введениями инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины.

Влияние кратности введения инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБГ на эффективности иммунизации

С целью проведения данных экспериментов (кратность и интервалы между введениями на эффективность иммунизации), эмульгированную вакцину (серия №2) вводили овцам внутримышечно по 1 мл однократно и

двукратно (бустерная доза). При двукратной иммунизации ревакцинацию проводили через 7, 14, 21 и 28 дней после первой. Контрольное заражение проводили на 60 сут. после первого введения. Суммарные результаты исследований показаны в табл. 3.20.

Данные, приведенные в табл. 3.20, показывают, что ревакцинация (бустерная доза) существенно не влияет на напряженность иммунитета у привитых животных. Изменение интервалов между введениями бустерной дозы вакцины также заметно не отражается на эффективности вакцинации.

Овцы, привитые однократно, проявляли такую же устойчивость к контрольному заражению гомологичными серотипами, как и овцы, вакцинированные двукратно, с интервалами между прививками в 7, 14, 21 и 28 дней.

Титр ВНА в сыворотках овец, привитых однократно и двукратно, перед контрольным заражением были в пределах от $(2,1 \pm 0,11)$ до $(3,5 \pm 0,43) \log_2$ для обоих серотипов ВБТ.

В литературе имеются многочисленные данные, указывающие на то, что инактивированные вакцины в большинстве своем создают напряженный иммунитет только после 2-3-х кратной иммунизации. В наших исследованиях, результаты показали, что ревакцинация (бустерная доза на 7, 14, 21 и 28 сут. после первой иммунизации) существенно не влияет на напряженность иммунитета у привитых животных. Изменение интервалов между введениями бустерной дозы вакцины также заметно не отражается на эффективности вакцинации.

Таблица 3.20 – Результаты иммуногенности вакцины в зависимости от кратности введения

Кратность введения вакцины	Интервал вакцинации, (дни)	Количество овец в опыте	Титр ВНА, log ₂		Реакция животных на контрольное заражение (баллы)	Эффективность вакцинации, %
			ВБТ-4	ВБТ-16		
Однократно		6	2,1±0,11	2,3±0,13	0	100
Двукратно	7	6	2,3±0,32	2,4±0,21	0	100
	14	6	2,3±0,19	2,4±0,17	0	100
	21	6	3,1±0,22	3,2±0,50	0	100
	28	6	3,2±0,43	3,5±0,10	0	100
Контрольные животные		4			21	0

Таким образом, однократная иммунизация животным инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной против 4 и 16 серотипов ВБТ в объеме 1 мл считается приемлемой для овец при формировании 100% иммунитета.

После установления оптимальной иммунизирующей дозы, кратности и метода введения инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины нами были выполнены исследования по изучению срока наступления и длительности иммунитета, создаваемого у привитых овец.

Определение сроков наступления и продолжительности иммунитета у овец после вакцинации

Для определения сроков наступления иммунитета инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины одновременно вакцинировали внутримышечно 16 овец в дозе 1,0 мл. Контрольное заражение проводили через 7, 10 и 14 дней после вакцинации. В каждый указанный срок заражали по 4 вакцинированных овец. Результаты этих опытов сведены в табл. 3.21.

Данные, представленные в табл. 3.21 показывают, что выраженный иммунитет у овец, привитых инактивированной вакциной, наступает через 10 сут. после вакцинации. При этом протективность вакцины составляет 50 %. На 14 сут. после иммунизации больше половины животных приобретают иммунитет, при этом протективность вакцины составила 75 %. В более ранние сроки после вакцинации у животных, привитых инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной против блутанга, иммунитет отсутствует.

Для определения продолжительности иммунитета животных, привитых инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной против блутанга, 48 голов овец однократно прививали вакциной внутримышечно в дозе 1,0 мл. После вакцинации овцы содержались в виварии и согласно п.2.2.11 проводился ежедневный клинико-температурный контроль в течение 360 дней, у которых на 7, 10, 14, 21, 28 сут. и затем через каждый месяц на

протяжении данного периода отбирали сыворотки крови для изучения динамики формирования антител в РН и ТФ-ИФА.

Таблица 3.21 – Результаты определения сроков наступления иммунитета у овец, вакцинированных инактивированной вакциной против ВБТ

Сроки заражения после иммунизации, сут	Количество овец в опыте	Титр ВНА, log ₂		Реакция на контрольное заражение		% протективности
		ВБТ-4	ВБТ-16	Количество реагиовавших овец	Суммарные баллы при контрольном заражении	
7	4	n	N	4	18	0
10	4	0,5±0,3	0,6±0,12	2	5	50
14	4	0,9±0,15	1,0±0,17	1	3	75
21	4	1,7±0,23	1,9±0,19	0	0	100
Контрольные животные	4			4	26	0
Примечание «n» – отсутствует ВНА в организме						

Динамика образования ВНА в организме иммунизированных овец, инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной из 4 и 16 серотипов ВБТ приведена на рис 3.24.

Из данных рис.3.24 видно, что после введения вакцины на 7 сут. в организме животных обнаруживались ВНА в титре 0,1-0,2 log₂. Увеличение титра антител отмечалось на 14 сут. от 0,83-0,9 log₂ против 4-го и 16-го серотипов, которые достигли своего максимального титра (6,1-6,4 log₂) на 60 сут. после вакцинации.

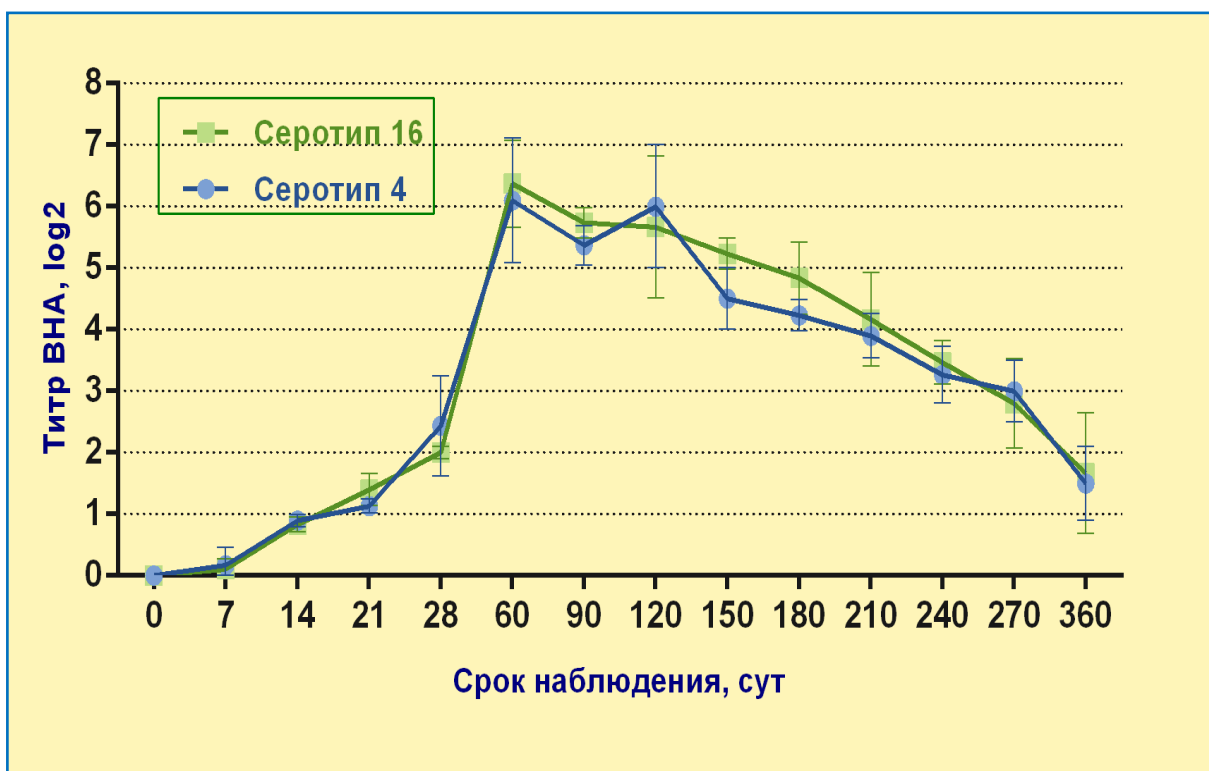


Рис.3.24. Динамика образования ВНА в организме привитых овец, инактивированной вакциной против ВБТ

На 90 сут после вакцинации наблюдается уменьшение титров антител до 4.5-5.2 log₂, которые постепенно снижались до титра 1.8 -2.0 log₂ на 360 сут после иммунизации. При этом уровень ВНА к обоим серотипам ВБТ в сыворотках крови иммунизированных овец не имели существенной разницы ($P \geq 0,05$).

Динамику формирования специфических антител к ВБТ и уровень напряженности иммунитета определяли в ТФ-ИФА коммерческой тест-системой фирмы ID-Vet (Франция) по оптической плотности (см. рис. 3.25).

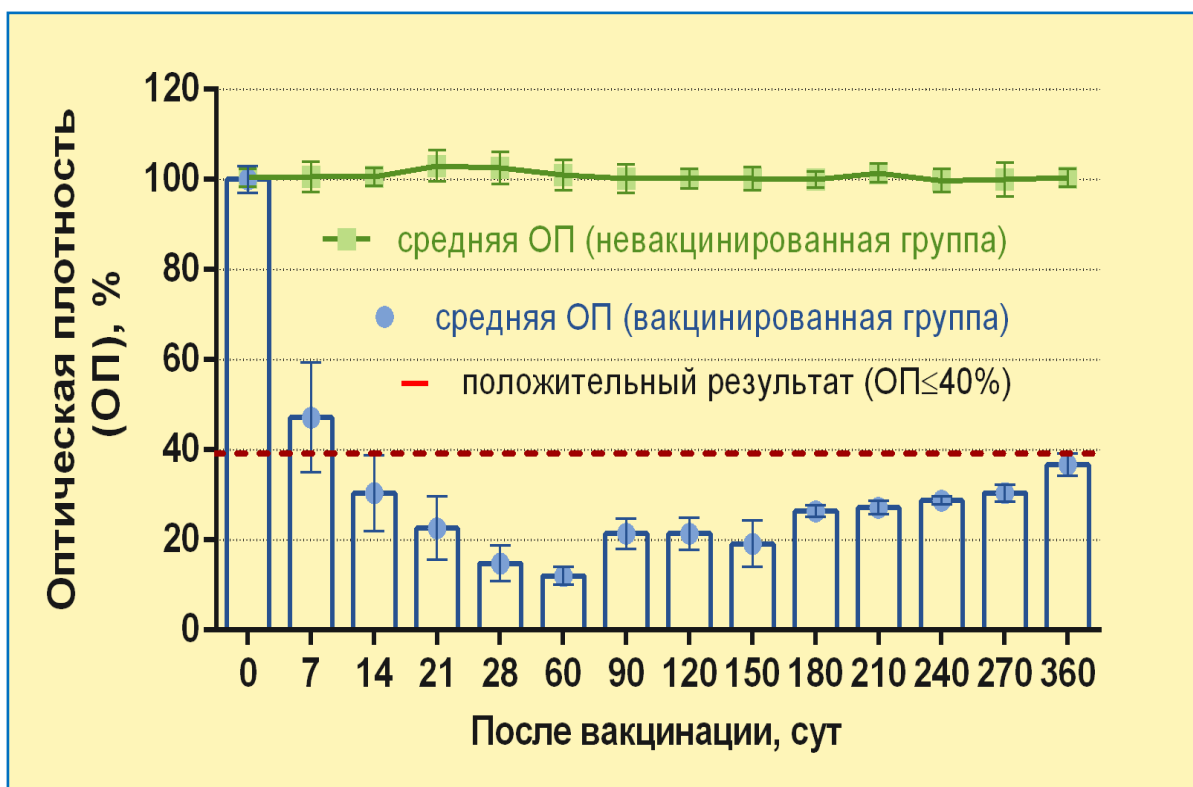


Рис. 3.25. Динамика уровня антител у животных после иммунизации

Таким образом, установлено наличие антител к структурному белку VP7 в организме всех иммунизированных овец с 7 по 360 сут. (срок наблюдения). Нами полученные результаты согласуются с литературными данными [193, 194] и не уступают по эффективности зарубежным аналогам.

Кроме определения вируснейтрализующей способности сывороток крови вакцинированных овец, нами были проведены опыты по резистентности привитых животных к контрольному заражению вирулентным вирусом, которые провели через 90, 180, 270 и 360 сут. после вакцинации. В каждый указанный срок наряду с вакцинированными, заражали по 4 интактных овцы. Подопытным животным внутривенно вводили гомологичный штамм патогенного вируса в объеме 10 мл (10^3 ИД₅₀/мл). Реакцию на контрольное заражение учитывали по бальной шкале (п.п 2.2.11) [199].

Характерные клинические признаки болезни, выявленные индивидуально у каждого привитого животного и в среднем для группы контрольных овец, представлены на рис. 3.26.

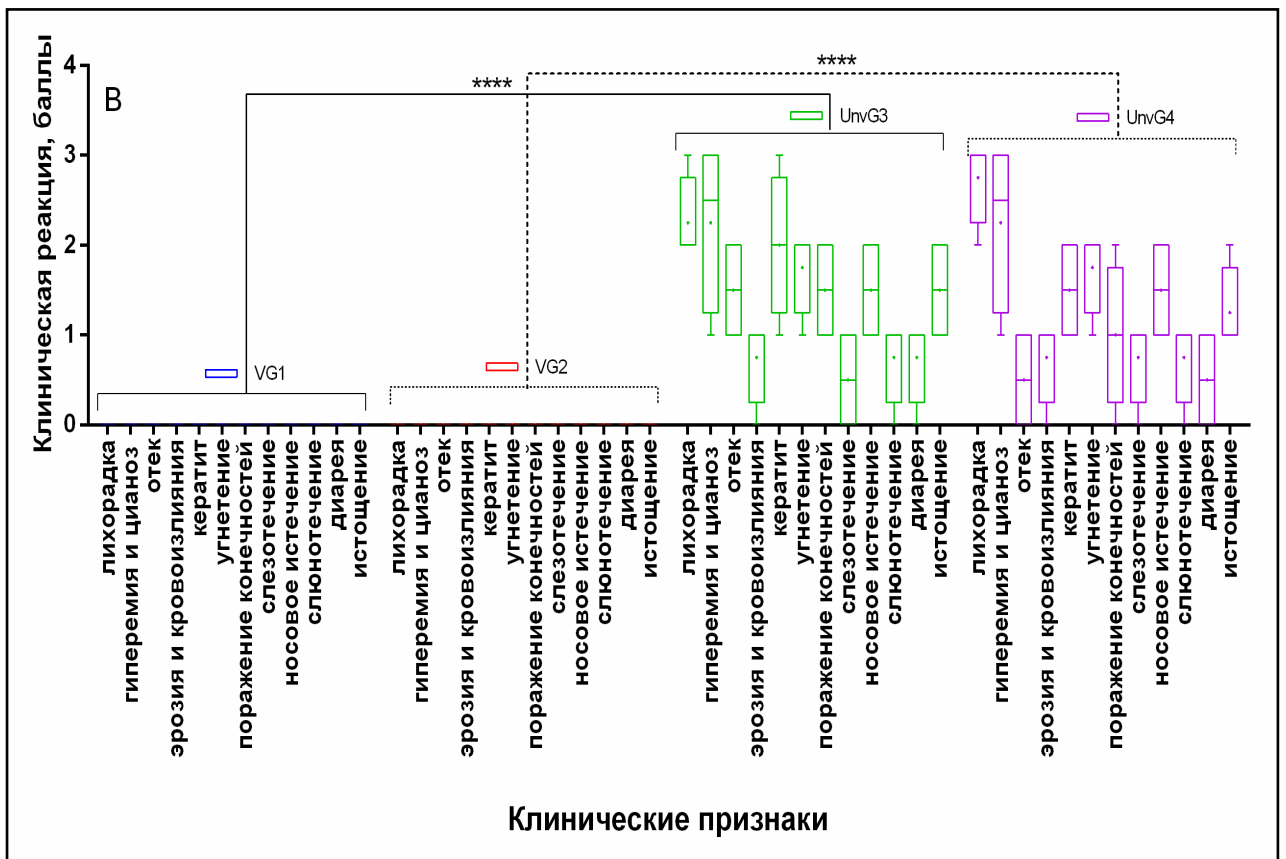
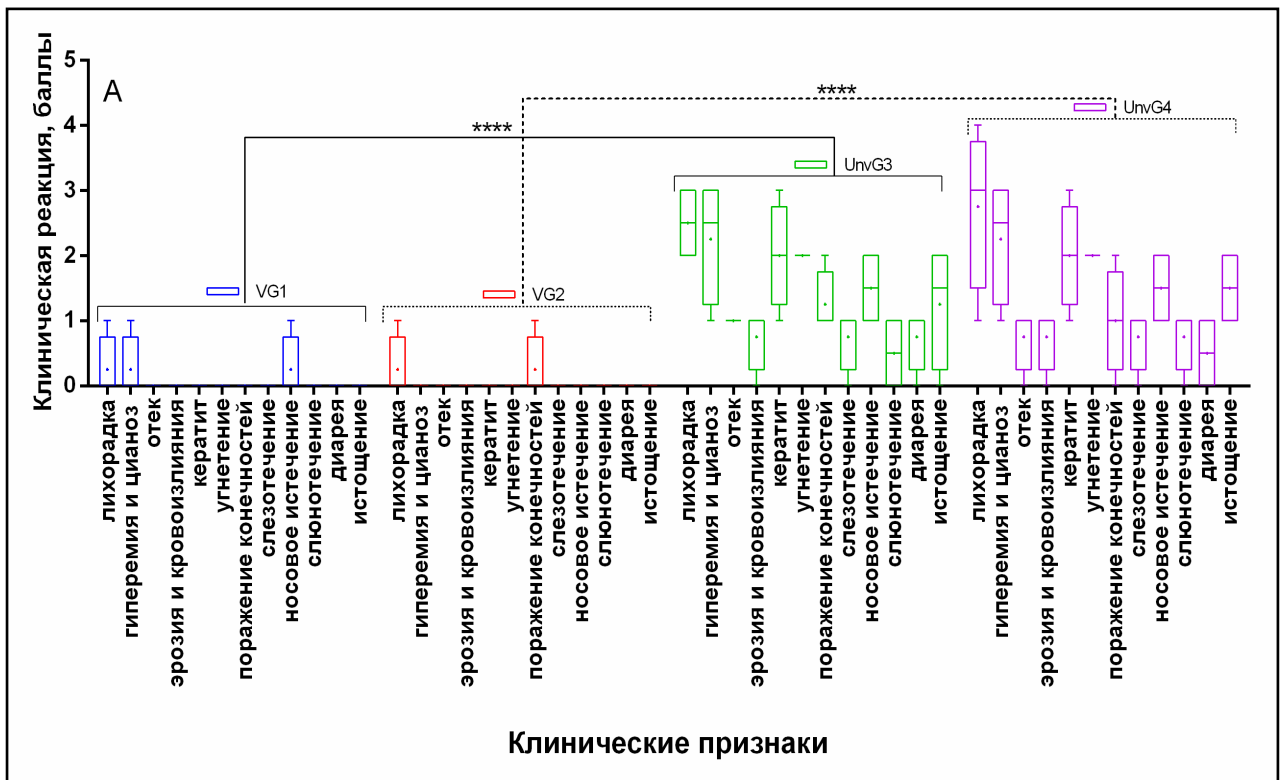


Рис. 3.26. Учет клинических признаков интактных и привитых овец на заражение вирулентными штаммами ВБТ в различные сроки после вакцинации,

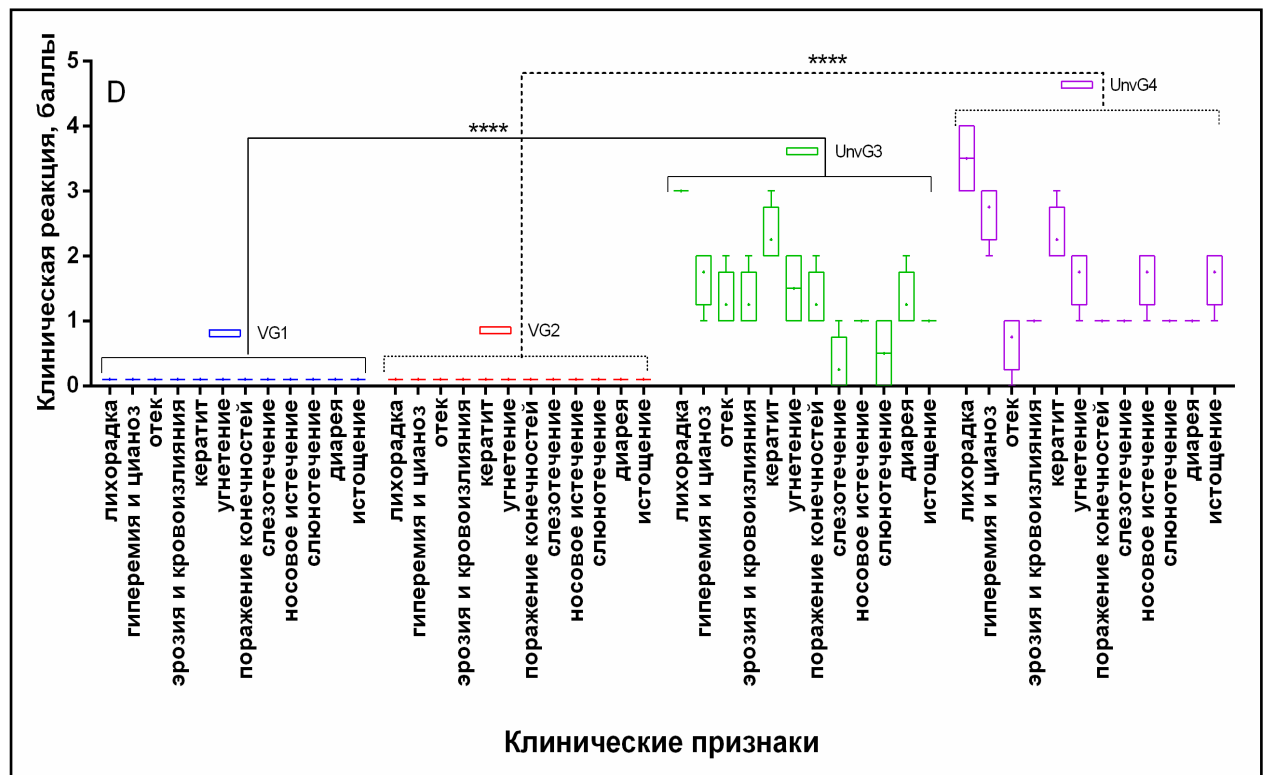
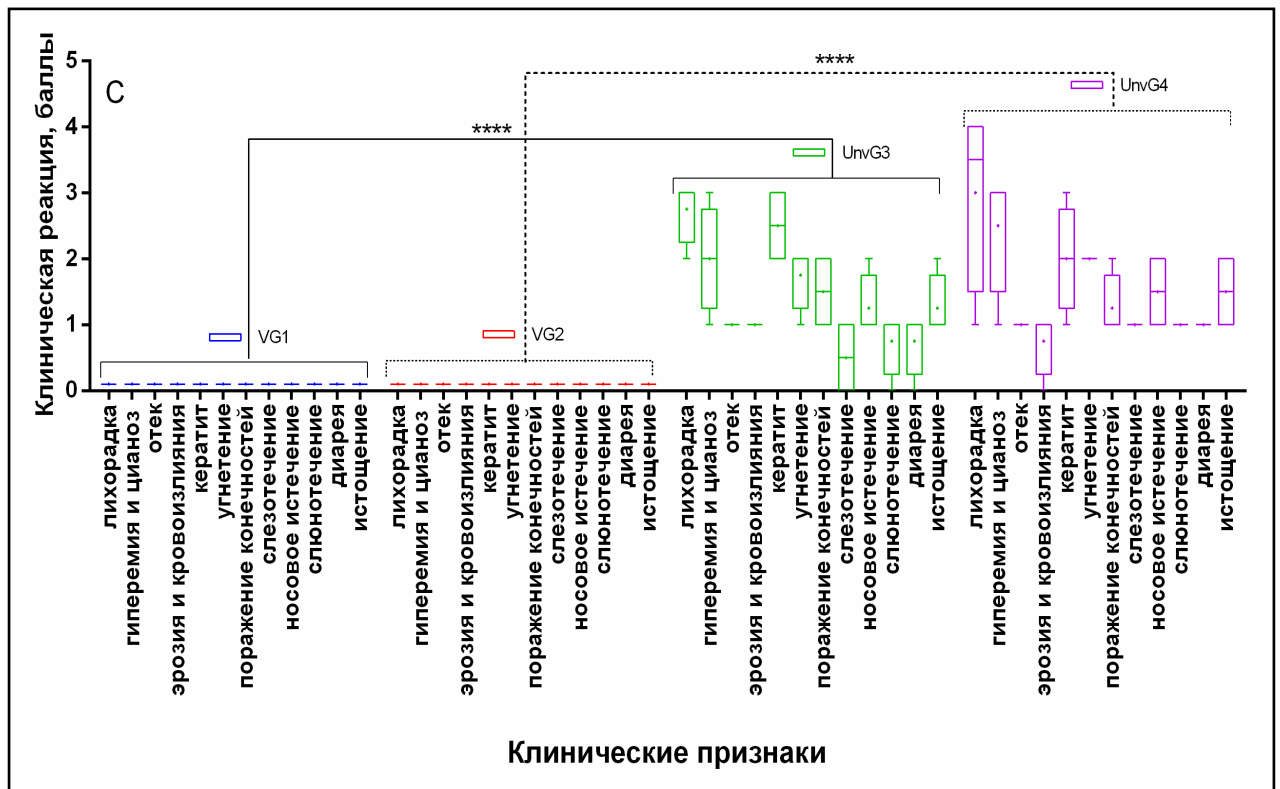


Рис. 3.26. Учет клинических признаков интактных и привитых овец на заражение вирулентными штаммами ВБТ в различные сроки после вакцинации,

A – 90 сут. ; **B** – 180 сут.; **C** – 270 сут.; **D** – 360 сут. Группы: **VG1** – иммунизированная инактивированной вакциной против ВБТ4 и ВБТ16, инфицированная эпизоотическом штаммом ВБТ4; **VG2** – иммунизированная инактивированной вакциной против ВБТ4 и ВБТ16, инфицированная эпизоотическом штаммом ВБТ16; **UnVG1** – невакцинированная, инфицированная эпизоотическом штаммом ВБТ4; **UnVG2** – невакцинированная, инфицированная эпизоотическом штаммом ВБТ16.

Как видно из данных, представленных в рис. 3.26, инактивированная эмульгированная бивалентная вакцина против 4 и 16 серотипов ВБТ обеспечивает защиту привитых животных в опытах контрольного заражения в период 360 сут. после вакцинации [199].

У вакцинированных овец, зараженных на 90 сут. после вакцинации, отмечали только повышение температуры тела до 40,2-40,3 °С. Других признаков заболевания не было отмечено. Проявление температуры оценивалось не более чем в один балл.

У контрольных, непривитых овец после заражения развивались признаки заболевания, характерные для БТ. Проявление клинических признаков болезни у этих невакцинированных животных были оценены в 20,8 баллов. При этом разница баллов между вакцинированными и контрольными животными составляла 19,8 баллов, и этот показатель оценивается как выраженный иммунитет у вакцинированных овец. Такой прочный и напряженный иммунитет против ВБТ отмечался у животных на 180, 270 и 360 сут. после иммунизации (рис. 3.26 В, С, D).

На введение эпизоотических штаммов ВБТ у вакцинированных групп не развивались признаки заболевания, характерные для блутанга, тогда как у овец контрольной группы отмечались такие клинические признаки БТ как повышение температуры тела до 41.1-41.5 °С, стоматит, гиперемия видимых слизистых оболочек, истечение из носовой полости и глаз, одышка, отек в области головы и шеи, хромота, диарея, отказ от корма, истощение. При этом

реакция на введение эпизоотических штаммов ВБТ у иммунизированных и контрольных животных в среднем по группе были $(0 \pm 0,00)$ и $(27 \pm 4,5)$ баллов, соответственно. Разница баллов между вакцинированными и контрольными группами (27 баллов) подтверждает о высокой иммуногенности тестируемой вакцины [199].

Таким образом, результаты проведенных исследований подтверждают, что данная вакцина против БТ обеспечивает создание напряженного иммунитета, который наступает через 10 сут. после вакцинации и длится не менее 360 сут.

Изучение виремии у вакцинированных животных после контрольного заражения

Изучение виремии в организме вакцинированных животных после контрольного заражения является одним из главных показателей при оценке эффективности вакцинного препарата. Для этого 18 гол. овец рандомизированно разделили на 3 групп по 6 овец, и все группы животных одновременно вакцинировали внутримышечно в дозе 1,0 мл. После вакцинации в I группе проводили контрольное заражение на 7 сут., во II группе на 10 сут., в III - на 14 сут.

После контрольного заражения из каждой группы нами были отобраны пробы цельной крови у вакцинированных животных с интервалом через одни сут. (на 2, 4, 6, 8, 10 12 и 14 сут. после инфицирования). Отобранные образцы крови в указанные сроки после инфицирования оценивали путем исследования в реал-тайм ПЦР. Аналогичная работа была проведена в отношении контрольных животных, также зараженных вирулентным вирусом 4 или 16 серотипов. Результаты исследований представлены на рис. 3.27.

Пробы, взятые в период с 4-го по 14 день после экспериментального инфицирования у вакцинированных (I группа) и контрольных животных, были позитивными в реал-тайм ПЦР с обнаружением РНК вируса (рис. 3.27 а, б).

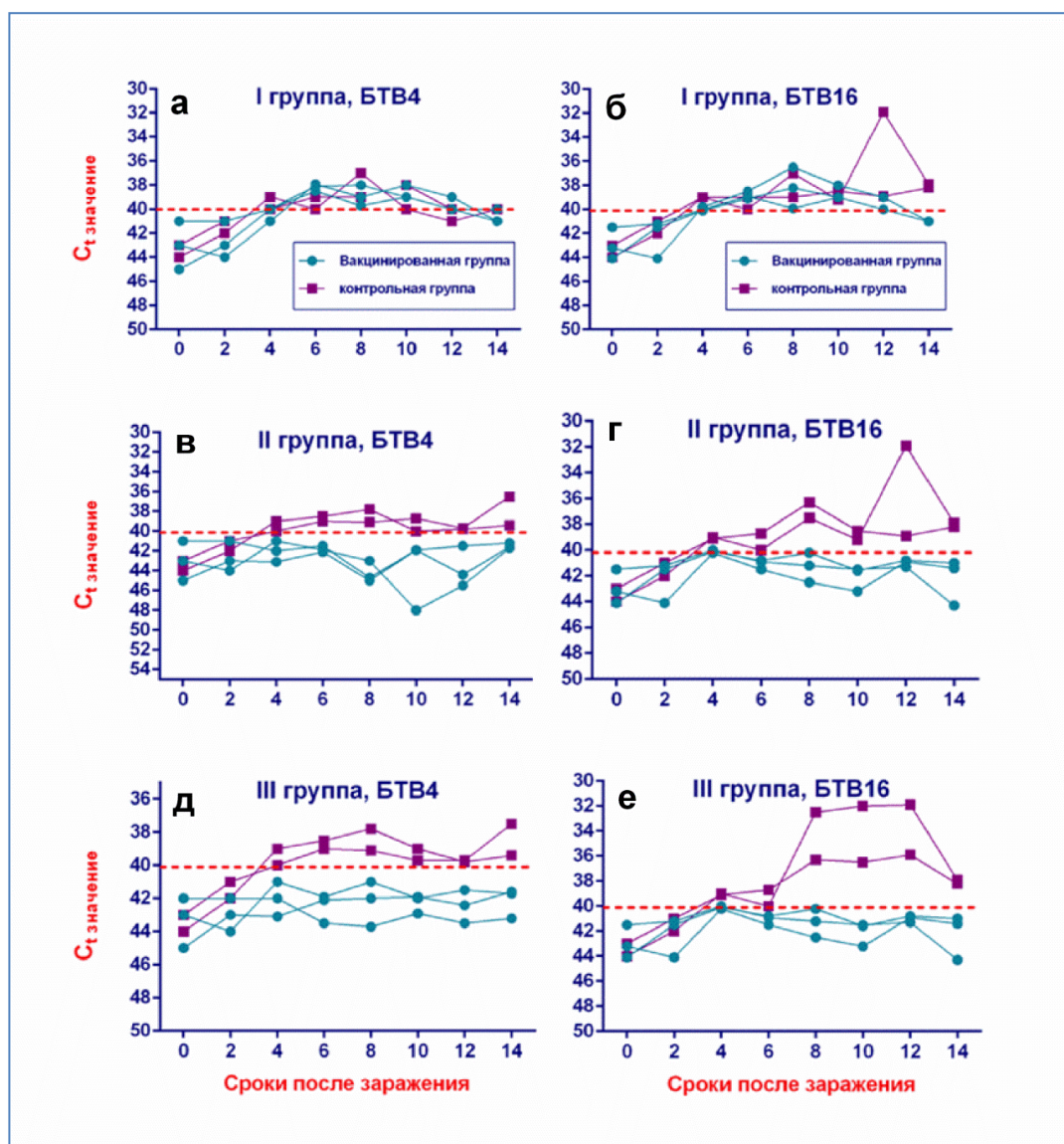


Рис. 3.27. Результаты ПЦР анализа у вакцинированных и контрольных групп, экспериментально зараженные вирусом блутанга 4 и 16 серотипов на 7, 10 и 14 сут. после вакцинации

а – на 7 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ4; **б** – на 7 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ16; **в** – на 10 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ4; **г** – на 10 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ16; **д** - на 14 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ4; **е** - на 14 сут. после вакцинации, животные инфицировали вирулентным штаммом ВБТ 4.

C_t значение до 40 – положительный; C_t value 41 и выше – отрицательный результат.

Исследования проб животных остальных группы (II, и III) показали, что все вакцинированные овцы (n=6 ВТV-4 or ВТV-16) были отрицательными (рис. 3.27 в, г, д, е). Тогда как все пробы контрольной (невакцинированной) группы в период с 4-го по 14 день после экспериментального инфицирования при исследовании были положительными на наличие РНК вируса.

Таким образом, на основе полученных результатов можно заключить, что разработанная нами вакцина вызывает напряженный иммунитет с 10 сут., которая не позволяет репликацию вируса, а также развитие виремии в организме вакцинированных животных.

Изучение иммуногенных свойств вакцины на козах и КРС

По литературным данным в естественных условиях к блутангу восприимчивы овцы, козы, КРС и дикие жвачные животные. У взрослых КРС болезнь протекает латентно и скрытно. Однако болезнь представляет очень важную проблему для воспроизводства стада. Установлено, что многочисленные случаи гибели эмбрионов, рождение телят с различными уродствами вызваны инфицированием коров ВБТ [180].

Как известно основным резервуаром ВБТ являются КРС и козы. Эти виды животных более привлекательны для мокрецов в качестве прокормителя по сравнению с овцами. Длительная виремия (до 3 лет) у КРС обеспечивает выживание возбудителя в межэпизоотический период [12]. Поэтому данные виды животных рассматриваются как главное звено в распространении заболевания среди восприимчивых животных. В связи с этой причиной при проведении противозэпизоотических мероприятий против БТ проводится массовая иммунизация именно КРС и коз.

На основании вышесказанного, в наших опытах изучали иммуногенность (прививная доза, сроки наступления и продолжительность иммунитета) разработанной вакцины на КРС.

Анализируя литературные данные [181-184], где иммунизирующая доза коммерческих инактивированных вакцин для КРС, как правило, превышает

прививной объем, предназначенный для овец в несколько раз, в исследованиях использовали двукратное увеличенное дозы вакцины. Для этого 12 голов КРС в возрасте 3-6 мес. прививали внутримышечно в область шеи в дозе 2,0 мл. Для определения уровня накопления антител у вакцинированных телят на 7, 14, 21, 28 сут. и далее ежемесячно отбирали образцы крови и исследовали в РН.

На первом этапе экспериментов изучали динамику формирования ВНА у привитых телят в зависимости от прививной дозы вакцины. Результаты исследований показаны на рис. 3.28.

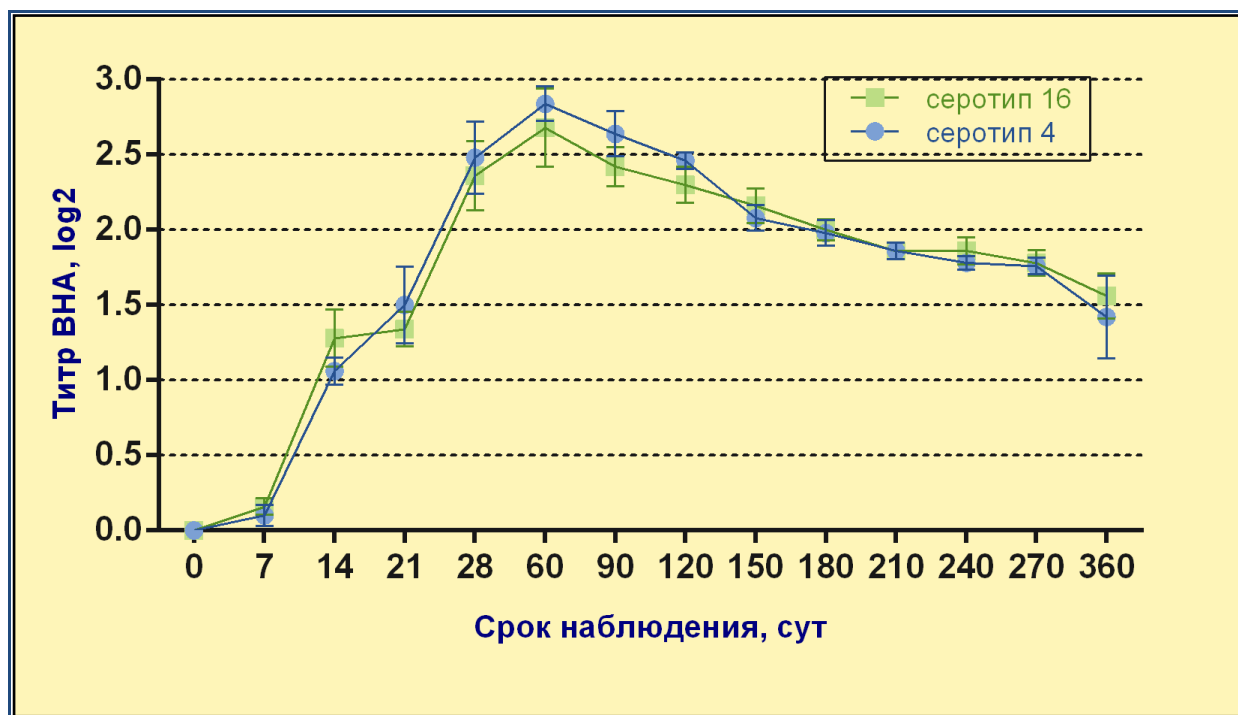


Рис. 3.28. Уровень образования ВНА у телят, привитых инактивированной эмульгированной вакциной против 4 и 16 серотипов ВБТ

На рис. 3.28 в виде кривой изображена динамика накопления ВНА у телят, привитых инактивированной вакциной. Кривая на рис. 3.28 показывает, что на 7 сут. начинают выявляться антитела в сыворотках вакцинированных КРС после иммунизации, достигая максимума на 60 сут., при этом титр был в пределах 3,0 и 3,1 log₂ для обоих серотипов. После чего

отмечается снижение титров ВНА животных до 1,5 и 1,6 на 360 сут. после вакцинации для 4 и 16 серотипов соответственно.

Продолжительность защитного эффекта вакцины определяли путем контрольного заражения вирулентным вирусом, которое проводили через 6 и 12 мес. после иммунизации. Результаты этих опытов сведены в табл. 3.22.

Как видно из данных представленных в табл. 3.22, инактивированная эмульгированная бивалентная вакцина против блутанга обеспечивают защиту привитых животных в опытах контрольного заражения в течение 12 мес после вакцинации. У вакцинированных телят, зараженных в указанные сроки после вакцинации, не отмечали признаков заболевания, тогда как у контрольных животных после заражения развивались признаки болезни, характерные для БТ и реакции на контрольное заражение составляли в среднем 15-16 баллов.

При экспериментальном заражении вакцинированных животных вирулентным вирусом, репликацию вируса в организме животных определяли исследованием крови в ПЦР. В результате проведенных исследований нами в ПЦР установлено, что в организме вакцинированных КРС не обнаружены РНК ВБ, что доказывает отсутствие репликации вируса, тогда как в крови невакцинированных животных были выявлены РНК вируса, в период с 4 по 14 сут. после контрольного заражения.

Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что длительность иммунитета у КРС вакцинированных в дозе 2,0 мл составила 12 мес.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина против БТ животных обеспечивает создание довольно напряженного иммунитета, который защищает КРС от вирулентного вируса не менее 360 сут.

Таблица 3.22 - Результаты продолжительности иммунитета и оценки протективности вакцины после контрольного заражения у крупного рогатого скота

Сроки контрольного заражения, мес	Бальная оценка клинических реакции животных на контрольное заражение						Подтверждение вирусемии с ПЦР-анализом				Эффективность вакцинации, % (Количество овец в опыте / заболевшие)			
	ВТВ-4			ВТВ-16			ВТВ-4		ВТВ-16		ВТВ-4		ВТВ-16	
	В	К	Разница баллов	В	К	Разница баллов	В	К	В	К	В	К	В	К
6	0.0±0.00*	16.0±0.84	16.0	0.0±0.00*	15.2±1.3	15.2	о	п	о	п	100 (3/0)	0 (2/2)	100 (3/0)	0 (2/2)
12	0.0±0.00*	15.6±1.09	15.6	0.0±0.00*	16.1±1.09	16.1	о	п	о	п	100 (3/0)	0 (2/2)	100 (3/0)	0 (2/2)

Примечания:

1. «В» - вакцинированная группа; «К» - контрольная группа;
2. «*» - от $P \leq 0.05$ до $P < 0.0001$ против контрольной группы;
3. «о» - отрицательный результат;
4. «п» - положительный результат.

Реакцию животных учитывали по 30-ти балльной шкале оценки признаков заболевания [11]. Напряженность иммунитета оценивали по клинической реакции (в баллах) у контрольных и вакцинированных животных: 0-7 баллов – отсутствие иммунитета; от 7 до 12 баллов – слабый иммунитет; от 12 до 16 баллов – умеренный иммунитет; свыше 16 баллов – выраженный иммунитет.

В следующих сериях опытов изучили динамику накопления антител у привитых коз. Для этого 15 гол. коз в возрасте 3-9 мес прививали внутримышечно в дозе 1 мл. Результаты этих опытов показаны на рис. 3.29.

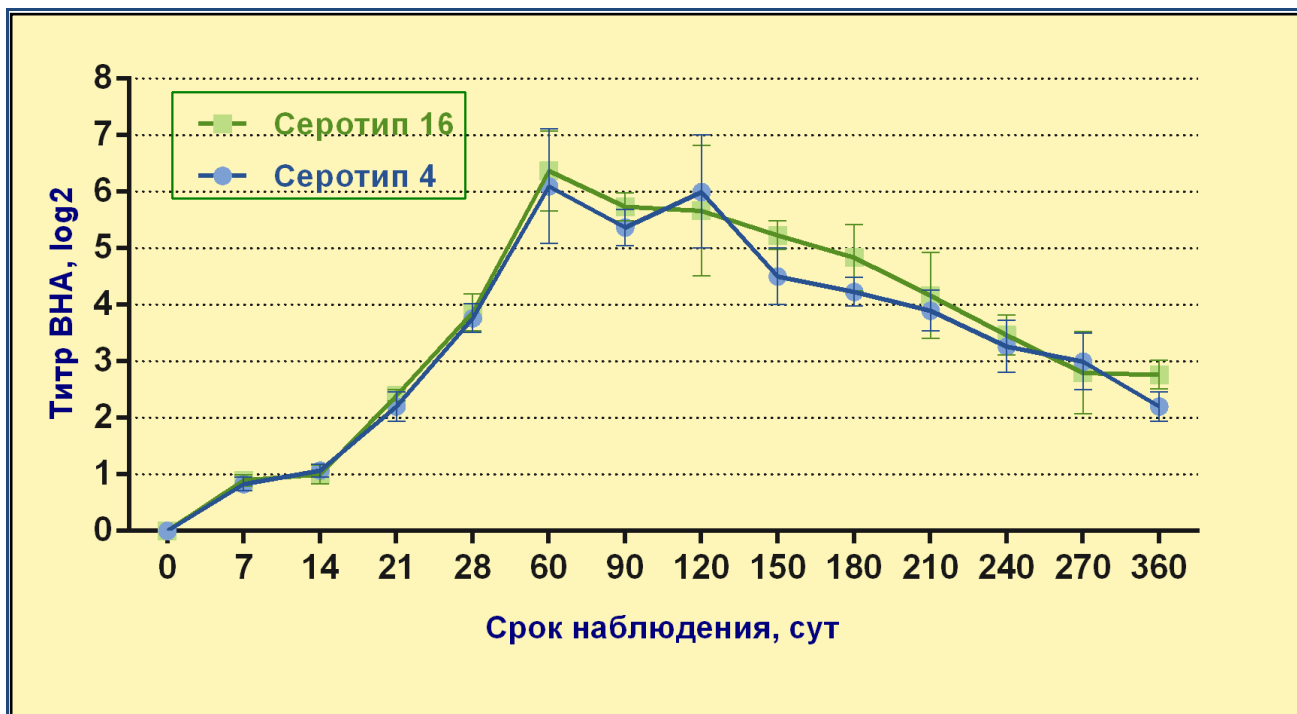


Рис. 3.29. Результаты формирования антител у коз, привитых инактивированной эмульгированной вакциной против БТ

Из данных рис.3.29 видно, что антитела в сыворотках привитых коз начинают выявляться через 7 сут. после вакцинации, достигая пика (6.0 – 6.3 log₂) через 1,5-2,0 мес., и сохраняются на этих титрах до 4-х мес., после чего отмечается снижение титра антител в сыворотках.

Эффективность вакцинации через 3, 6 и 9 мес. после контрольного заражения показала 100 % защиты от вирулентных штаммов ВБТ.

Исходя из вышеуказанных данных продолжительность иммунитета у коз, привитых в дозе 1,0 мл, составляет 12 мес.

Анализируя результаты в ходе проведенных исследований, нами были сделаны следующие выводы:

- разработанная новая бивалентная вакцина против 4 и 16 серотипов ВБТ с новым коммерческим адъювантом Montanide™ ISA-71VG обладает достаточно выраженной иммуногенностью на МРС и КРС при однократной иммунизации;
- срок наступления иммунитета при однократной иммунизации у коз, овец и КРС формируется на 10 сут после вакцинации;
- длительность иммунитета при однократной иммунизации у вакцинированных животных в объеме 1,0 мл у овец и коз, составляет 12 мес;
- длительность иммунитета при однократной иммунизации у КРС, привитых в объеме 2,0 мл составляет 12 мес;
- наиболее оптимальная иммунизирующая доза вакцины для МРС принята в объеме 1,0 мл, а для КРС 2,0 мл.

Таким образом, результаты исследований показали, что приготовленная по разработанной нами технологии инактивированная эмульгированная бивалентная вакцина обладает хорошей иммуногенностью и в следующих опытах представлялось весьма целесообразным изучить сохраняемость иммуногенных свойств штаммов ВБТ до и после инактивации в нативном виде, а также самого готового препарата при длительном хранении.

Определение устойчивости нативных вируссодержащих материалов штаммов вируса блуганга при различных условиях хранения

Сохранение качества полуфабрикатов, используемых при производстве биопрепаратов, является одним из важнейших требований в биологической промышленности. Чтобы быть готовым к любым чрезвычайным ситуациям, возникающим в процессе производства, необходимо изучить условия хранения вирусных материалов, используемых при производстве биопрепаратов в различных температурных режимах. Поэтому изучение правильного хранения вирусного материала в нативном виде в ходе технологического процесса изготовления биопрепарата имеет важное значение.

С этой целью для изучения устойчивости штаммов 4 и 16 серотипов ВБТ к воздействию различной температуры были приготовлены партии

вирусодержащих суспензий, которые сохраняли при температурах $(36,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, $(23 \pm 3)^\circ\text{C}$, $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ и минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через различные времена из каждой партии брали по 3 пробы и определяли остаточную активность методом титрования в культуре клеток. Результаты этих опытов представлены на рис. 3.30.

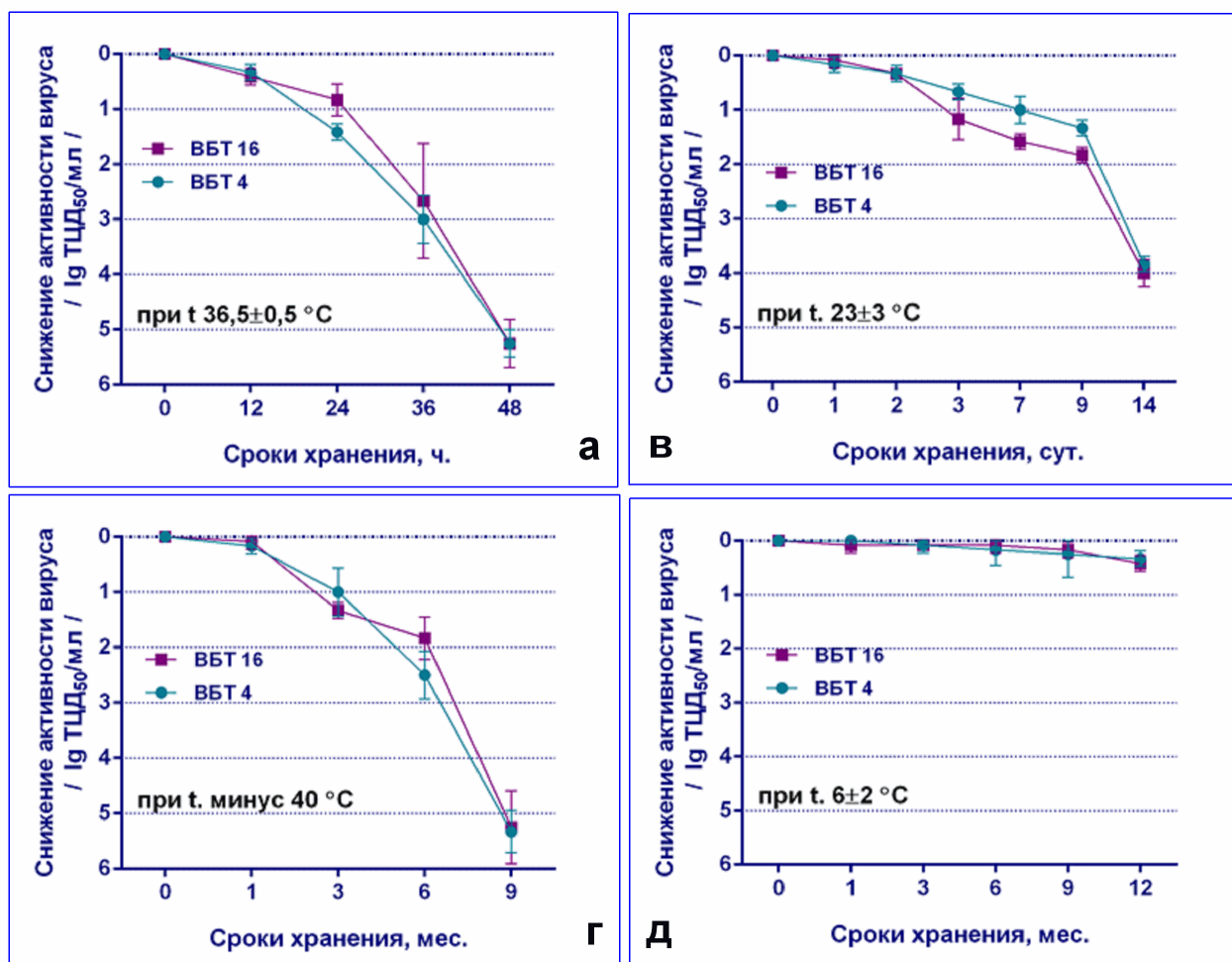


Рис. 3.30. Устойчивость штаммов ВБТ в культуральной жидкости при различных температурах: а – $(36,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$; в – $(23 \pm 3)^\circ\text{C}$; г – $(\text{минус } 40 \pm 1)^\circ\text{C}$; д – $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Как видно из приведённых на рис. 3.31а данных, биологическая активность штаммов вируса блутанга значительно быстрее падала при температуре $(36,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. За 1 сут. отмечено снижение титра на $0,5 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$, а через 4 суток снижение биологической активности вируса достигло $5,5 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$.

Несколько выше устойчивость штаммов вируса блутанга была при комнатной температуре ($(23\pm 3)^\circ\text{C}$). Снижение его активности через сут. составило $0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, через 3 сут. - $0,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, через 9 сут. - $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и к 14 сут. $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (рис. 3.31в).

При температуре (минус 40 ± 1) $^\circ\text{C}$ титр вируса через 1 мес. хранения снижается на $0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, через 3 мес. - на $1,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, через 6 мес. на $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и через 9 мес. - на $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (рис. 3.31г). В доступных литературах имеются данные о том, что наработанный вирусосодержащий полуфабрикат для конструированной вакцины сразу хранится при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$, однако не допускается медленное замораживание, которое, вследствие чего может принести развал антигена самого вируса.

Более высокая устойчивость при хранении штаммов вируса в нативных вирусосодержащих материалах отмечена при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$. Хранение вирусосодержащих суспензий при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ показало, что эта температура наиболее благоприятна для сохранения жизнеспособности вируса в течение 12 мес., снижение цитопатической активности его за этот период достигало $0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (рис. 3.31д).

Далее при различных температурных режимах нами были изучены сохраняемость активность антигена вирусосодержащего материала, инаktivированной 0.1% БПЛ. Для этого инаktivированные культуральные вирусосодержащие материалы были оставлены на хранении при различных температурных условиях. Через определённые времени из каждой серии инаktivированного материала отбирали пробы для определения активности антигена методом ТФ-ИФА. Результаты этих опытов представлены в табл. 3.23.

Таблица 3.23 – Определение активности антигена инактивированного материала в нативном виде при различных температурных режимах.

Температура хранения, °С	Длительность хранения	Антигенная активность в ТФ-ИФА	
		4-серотип	16-серотип
36,5±0,5	12 час.	1:128	1:64
	24 час.	1:64	1:64
	26 час.	1:16	1:16
	48 час.	1:16	1:8
23±3	1 сут.	1:128	1:128
	3 сут.	1:128	1:128
	9 сут.	1:128	1:128
	14 сут.	1:64	1:64
6±2	1 мес.	1:128	1:128
	3 мес.	1:128	1:128
	6 мес.	1:64	1:128
	9 мес.	1:64	1:64
	12 мес.	1:32	1:16
Примечания: 1 «-» - антигенная активность не обнаружена; 2 «б/и» - без инактиванта.			

Из данных таблицы 3.23 видно, что при температуре (36,5±0,5) °С активность антигена за 12 час. несущественно снизилась, через 24 час. активность утрачена на 1 порядок и составила 1:64. Спустя 48 час. активность антигена уменьшилась почти на 4 порядка и составила 1:16.

Сохраняемость антигена осталась без изменений при комнатной температуре в течение 9 сут, однако на 14 сут активность антигена инактивированного материала уменьшилось на 1 порядок и показала 1:64.

Более высокая сохраняемость антигена инактивированного вируса в нативным виде отмечена при температуре (6±2) °С. Данная температура не оказывает существенного влияния на уровень антигенной активности инактивированного вируса, но оказывает существенное снижение его активности при условиях длительного хранения. При этом длительность хранения инактивированного полуфабриката должны быть не более 3 мес.

Полученные результаты свидетельствуют, что устойчивость вирусодержащих суспензий штаммов ВБТ позволяет сохранять его активность в течение времени, необходимого для проведения с ним различных манипуляций в зависимости от целей проводимых опытов.

Определение годности вакцины при различных условиях хранения

Для определения условий хранения и транспортировки вакцины в производственных условиях, обеспечивающей сохранность ее иммуногенных свойств, разработанную вакцину хранили при различных температурно-временных режимах. Разрушение эмульсии в виде отслоения масляной фракции не установлено при ее визуальном осмотре. Для определения срока годности вакцины в нативном состоянии ее хранили при температуре (20 ± 2) °С, (37 ± 1) °С в течение 5, 10, 20 сут и $(2-8)$ °С в течение 6 и 12 мес. Через указанные сроки хранения при различных температурных режимах вакцины прививали по 4 гол. овец в возрасте 3-9 мес. Оценку иммуногенности вакцины проводили согласно методике, указанной в п.2.2.11. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 3.24.

Таблица 3.24 – Иммуногенная активность и стабильность вакцины при различных условиях хранения

Показатели вакцины	Температура и срок хранения					
	(2-8) °С		(20±2) °С		(37±1) °С	
	6 мес.	12 мес.	10 сут.	20 сут.	5 сут.	10 сут.
Титр ВНА в РН, log ₂	2,5±0,23	2,1±0,17	1,9±0,11	1,8±0,15	1,1±0,12	0,8±0,05
	2,8±0,21	2,3±0,13	2,0±0,43	1,8±0,37	1,2±0,14	0,9±0,07
Стабильность эмульсии	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
Количество иммунных овец	4	4	4	4	4	2
Количество овец в опыте	4	4	4	4	4	4
Средняя оценка в баллах	0	0	0	0	0	15
Эффективность вакцинации, %	100	100	100	100	100	50
Примечания						
1 Числитель – титр ВНА к ВБТ4; 2 Знаменатель – титр ВНА к ВБТ16.						

Из данных табл. 3.24 видно, что вакцина при температурах (20 ± 2) °С, (37 ± 1) °С в течение от 5 до 20 сут. хранения и при $(2-8)$ °С в течении 12 мес. сохраняет иммуногенные свойства и способна вызывать у привитых животных формирование стойкого иммунитета, который обеспечивает устойчивость их к контрольному заражению.

Иммуногенные свойства инактивированной вакцины, хранившейся при температуре (37 ± 1) °С в течение 10 сут., существенно снизилась ($p > 0.05$), так как привитые 2 овцы на контрольное заражение реагировали повышением температуры тела до $(40,3 - 40,7)$ °С и отмечались другие клинические признаки болезни. Реакция оценивалась в 15 баллов.

Суммируя результаты проведенных исследований, следует отметить, что инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина при температурах (20 ± 2) °С, (37 ± 1) °С в течение от 5 до 20 сут. хранения и при $(2-8)$ °С в течении 12 мес сохраняет иммуногенные свойства (срок наблюдения). При этом физические и иммунобиологические характеристики вакцины сохранялись в течение всего срока наблюдения и не установлены признаки разрушения эмульсии в виде отслоения водной и масляной фракции. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный нами препарат способен сохранять иммуногенность при хранении в нормальных и экстремальных температурных режимах в течение сроков, удовлетворяющих требованиям МЭБ, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам [20].

3.5. Комиссионные испытания технологии изготовления, физических и биологических характеристик вакцины

Для проверки безопасности и иммуногенности инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ (катаральной лихорадки овец) 4 и 16 серотипов было организовано и проведено внутриинститутское комиссионное испытание, которое полностью подтвердило результаты

проведенных выше исследований (Приказ Генерального директора НИИПББ № 139/09-06 от 06.04.2011 г., в период с 06.04.2011 г. по 30.09.2011 г.).

Комиссионные испытания проводились в соответствии с Программой проведения испытаний вакцины, утвержденной директором института 06.04.2011 года и НТД вакцины.

В ходе комиссионных испытаний по усовершенствованной технологии была изготовлена опытная серия вакцины в количестве 5000 доз. Членами комиссии проверены технические характеристики и иммунобиологические свойства вакцины.

В результате комиссионной проверки вакцины установлено следующее:

1. Комиссия проверила технологию изготовления инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ 4 и 16 серотипов. По предложенной технологии изготовлена инактивированная эмульгированная бивалентная вакцина против БТ. Проверка иммунобиологических свойств показала, что вакцина соответствует требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам для животных.

2. Вакцина представляет собой стойкую однородную эмульсию беловатого цвета без посторонних примесей, рН вакцины составил $7,33 \pm 0,11$.

3. Вакцина стерильна и не контаминирована посторонними микроорганизмами.

4. Вакцина безопасна для кроликов и овец при введении в дозе 1 мл и 5 мл, соответственно.

5. При однократном введении вакцины МРС в дозе 1 мл и КРС в дозе 2 мл, через 14 сут. вакцина на 100 % защищает привитых животных от контрольного заражения патогенным вирусом БТ 4 и 16 серотипов.

Технология изготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против БТ 4 и 16 серотипов соответствует представленной НТД.

Подробная информация о комиссионной проверке иммунобиологических и физических свойств данной вакцины представлена в протоколе и акте комиссионной проверки вакцины (**Приложение 10**).

3.6. Заключение

Глобальное распространение БТ получило значительное внимание со стороны МЭБ после вспышек в Европейских странах. Болезнь вызывает массовую смертность среди овец. Ареал распространения ВБТ расширился в зонах между 35° южной и 40° северной параллелями за счет международной торговли животными и животноводческими продуктами, а также изменением климата. Все это могло повлиять на циклы жизнедеятельности, численность и способность к переносу инфекции среди кровососущих насекомых вида *Culicoides*, обитающих в регионах, где были зарегистрированы случаи заболевания [185].

На сегодняшний день эпизоотическая ситуация с этим заболеванием ухудшается, заболевание прогрессирует и расширяет свои границы в азиатском регионе. Так, научные исследования, проведенные в конце 90 годов в Казахстане [8] и в 2007-2008 в Монголии выявили антитела к ВБТ в сыворотке жвачных животных [9]. В 2013 г. в Кыргызстане были выявлены антитела к ВБТ [7], что свидетельствует о присутствии природно-очаговой инфекции в приграничных зонах Республики Казахстан. За последние 20 лет каких-либо целенаправленных исследований по серологическому мониторингу распространения инфекции в Казахстане не проводилось. По этой причине и, принимая во внимание распространенность ряда патогенов как на глобальном уровне, так и на уровне соседних стран, серологический мониторинг БТ сельскохозяйственных и диких жвачных животных в Республике Казахстан представляют огромный интерес.

В связи с этим нами проведены серологические исследования территории южного региона Казахстана. Это позволило определить

иммунный статус животных, оценить эпизоотическую ситуацию в анализируемом регионе, подтвердить или опровергнуть гипотезу о циркуляции ВБТ на юге Казахстана. В результате проведенных исследований установлено, что антитела в сыворотках крови МРС к ВБТ содержались в 12,5 % случаев, также 35,3% сывороток крови КРС были положительными, что свидетельствует о наличии ВБТ.

С расширением ареала распространения ВБТ из стран Африки, Европы и Юго-Восточной Азии многократно возрос спрос на инактивированную вакцину против БТ. Так, из-за определенных рисков, связанных с использованием живых вакцин, в том числе тератогенности, реверсии вирулентности, подавление иммунитета и генетической ассоциации серотипов, инактивированные вакцины считаются более безопасными, и используются успешно во многих европейских странах, для контроля вспышек, снижения вирусемии и циркуляции вирусов [98].

Нестабильная эпизоотическая ситуация по БТ в мире и отсутствие специфических профилактических препаратов из-за большого числа серотипов (известно 27 серотипов) [65], не создающих у животных перекрёстного иммунитета, требует от многих стран мира разработать свою технологию для изготовления отечественной вакцины против данной болезни.

В связи с этим в НИИПББ выполнялся научный проект на тему: «Разработка высокоэффективных средств профилактики и диагностики катаральной лихорадки овец» в рамках Республиканской научной программы: «Разработка и использование генно-инженерных и клеточных технологий в медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, пищевой и перерабатывающей промышленности на 2009-2011 гг.» при финансировании Министерством образования и науки Республики Казахстан.

По мнению многих авторов, идеальная вакцина против блутанга должна быть эффективной, безопасной и коммерчески доступной, дешевой,

защищать от болезни, блокировать вирусную репликацию, вызывать иммунитет быстро и длительно при однократной вакцинации, не восстанавливать вирулентность, а также поддерживать стратегию дифференциации инфицированных животных от вакцинированных [195]. Однако, в настоящее время нет в ветеринарной практике ни одного типа вакцины против данной инфекции, который отвечает всем вышеуказанным критериям. Тем не менее, в данный момент инактивированная вакцина является предпочтительной в практике среди других типов вакцины против блутанга, таких как живая, рекомбинантная, субъединичная и другие.

Известно, что наряду с преимуществами, инактивированные вакцины, вследствие трудности технологии приготовления, имеется ряд недостатков, значительно влияющих на их иммуногенную эффективность обеспечиваемого ими иммунитета у животных. Поэтому цель наших исследований заключалась в получении отечественной усовершенствованной технологии изготовления инактивированной бивалентной вакцины против ВБТ, обладающей высокой эффективностью и безопасностью для МРС и КРС.

При выполнении раздела диссертации по разработке технологии изготовления вакцины против блутанга, проведены исследования по выбору системы культивирования вируса, определению оптимальных условий культивирования, выбору инактиванта и изучению режимов инактивации, подбору оптимальных адъювантов и изучению иммунобиологических свойств полученных образцов вакцин.

Для получения высокоактивного производственного вируса в биопромышленных условиях важным было подобрать чувствительную биосистему и отработать оптимальные параметры культивирования вируса.

В результате проведенных исследований разработан технологический регламент получения высокоактивной вирусной суспензии, включающий следующие параметры: концентрация сыворотки в поддерживающей среде 5 %; заражающая доза вируса в пределах от 0,1 до 0,2 ТЦД₅₀/кл; температура

культивирования ($36,5 \pm 0,5$) °С; продолжительность культивирования 120 ч. При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать вирусосодержащую суспензию с биологической и антигенной активностью не ниже $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и 1:16, соответственно, пригодные для изготовления инактивированной вакцины против БТ. Полученные результаты были статистически достоверны ($P < 0,05$) и воспроизведены не менее в 10 экспериментах в лабораторных условиях, а также 5 крупномасштабных наработках вируса в производственных условиях.

Далее для установки конкретных параметров инактивации в процессе экспериментов нами были детально изучены действие БПЛ на вирусы с учетом при различных концентрациях, температуры, рН среды. При этом, на основании проведенных исследований оптимальными параметрами инактивации БПЛ ВБТ являются: конечная концентрация инактиванта 0,1 %, температура реакционной среды ($37 \pm 0,5$) °С, значение рН реакционной среды (7,0-7,4), продолжительность инактивации 12 час. При отработанном режиме, инактивант максимально сохраняет исходную антигенную активность данного вируса.

Оптимальные параметры инактивации вируса БПЛ были достоверны ($P < 0,05$) и воспроизведены не менее чем в 10 лабораторных опытах и при получении 5 крупномасштабных серий инактивированной культуральной вирусосодержащей суспензии. Следует отметить, что во всех опытах процесс инактивации ВБТ был полным и необратимым.

Для повышения эффективности инактивированных вакцин против БТ, были проведены многие исследования, по поиску вспомогательных веществ, способных повысить гуморальный и клеточный иммунный ответ организма. В результате анализа литературных данных в качестве эффективных адъювантов для вакцины против БТ чаще всего используются ГОА, комплекс ГОА с сапонином и масляный адъювант Montanide ISA. При сравнительном изучении иммуностимулирующей эффективности и реактогенности подобранных адъювантов, ввиду наилучших иммунобиологических

показателей, был признан оптимальным и включен в состав вакцины новый коммерческий масляный адъювант Montanide ISA-71VG [198].

Для выяснения эффективности вакцинных препаратов, вводимых животным, нами проведены опыты по определению оптимальной прививной дозы, методы и кратности введения инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против БТ, а также срока наступления и продолжительность иммунитета у животных после вакцинации.

Подводя итоги, на основании сравнительного анализа при изучении иммуногенных свойств вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против ВБТ 4 и 16 серотипов с другими авторами, можно отметить, что разработанный нами препарат вызывает напряженный и длительный иммунитет, характеризует себя как весьма эффективный препарат и не уступает по иммуногенности зарубежным аналогам. Она удобна для применения в ветеринарной практике, так как исключается необходимость ревакцинации привитых животных на протяжении года.

Также нами разработанный препарат способен сохранять иммуногенность при хранении в нормальных и экстремальных температурных режимах в течение сроков, удовлетворяющих требованиям МЭБ, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам [20].

В заключении нужно отметить, что для повышения эффективности вакцины был впервые использован, новый коммерческий масляный адъювант Montanide™ ISA-71VG, разработанный французской компанией «Seppic» предназначенный для ветеринарных вакцин.

В целом задачи, вытекающие из цели диссертационной работы, были выполнены в полном объеме. Представленные в работе экспериментальные данные статистически достоверны, значимость всех опубликованных величин была не ниже первого критериального порога ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных опытов можно сделать следующие выводы:

1. Изучена эпидемиологическая ситуация по блутангу в южных регионах Казахстана. При этом установлены положительные пробы на антитела ВБТ в 11,85% пробах МРС и 14,21% пробах КРС из общего числа обследованных проб, что свидетельствует о циркуляции вируса БТ в данных регионах.

2. Совершенствованы условия суспензионного культивирования ВБТ в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 и определены следующие параметры: доза заражения от 0,1 до 0,2 ТЦД₅₀/кл, содержание сыворотки крови КРС в поддерживающей питательной среде - 5%, инкубирование при температуре 37 °С в течение 120 ч. Соблюдение вышеуказанных параметров, позволяет получать вирусосодержащую суспензию с высокой биологической (не ниже 6,50÷6,75 lgТЦД₅₀/мл) и антигенной (1:16) активностью.

3. Совершенствован режим инаktivации вируса бета-пропиолактоном, который в конечной концентрации 0,1% инаktivирует вирус в реакционной среде в течение 12 ч, при температуре 37 °С с рН 7,0-7,4 без потери антигенных свойств.

4. Совершенствован адъювантный состав инаktivированной вакцины, в результате которой был подобран масляный адъювант Montanide™ ISA-71VG обладающей более иммуногенной активностью, умеренной ректогенностью и низкой вязкостью в составе инаktivированной бивалентной вакцины.

5. Вакцина с адъювантом Montanide™ ISA-71VG в дозе 1,0 мл (для МРС) или 2,0 мл (для КРС) при однократной внутримышечной иммунизации создает иммунитет у животных длительностью не менее 12 мес (срок наблюдения).

6. Изучены срок годности и стабильность вакцины при различных температурно-временных режимах. Разработанная бивалентная эмульгированная вакцина против БТ сохраняет свои иммуногенные свойства и стабильность при (2-8) °С в течение 12 мес.

7. По результатам комиссионных испытаний технологии приготовления инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против блутанга составлен Акт и протокол. Разработана нормативно-техническая документация.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Совершенствованную технологию изготовления инактивированной бивалентной эмульгированной вакцины против БТ предлагается использовать в биологической промышленности для создания безопасной и иммуногенной вакцины для сельскохозяйственных животных.

Разработан и утвержден в установленном порядке комплект НТД на вакцину, включающий (**Приложение 9**):

- Стандарт организации на вакцину СТ 405-1919-04 ГП-070-2011. Вакцина инактивированная эмульгированная против блутанга (катаральная лихорадка овец);
- Временная инструкция по изготовлению и контролю вакцины инактивированной бивалентной эмульгированной против блутанга (катаральная лихорадка овец);
- Временное наставление по применению вакцины инактивированной бивалентной эмульгированной против блутанга (катаральная лихорадка овец).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bluetongue virus spread in Europe is a consequence of climatic, landscape and vertebrate host factors as revealed by phylogeographic inference. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017 [Электронный ресурс] / M. Jacquot, K. Nomikou, M. Palmarini [et al.]. – Режим доступа: rspb.royalsocietypublishing.org/content/284/1864/20170919/. – Загл. с экрана.
2. Вспышка катаральной лихорадки овец в Бурятии [Текст] / В. П. Левченко, Г. А. Угрюмов, В. Г. Гончиков [и др.] // Журн. ветеринария. – 1995. – № 4. – С. 7-8.
3. Луницын, Ф. В. Мониторинг блютанга импортных животных [Текст] / В. Г. Луницын, О. Н. Жигалева // Всесоюз. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ). – Покров, 2008. – С. 20.
4. Блютанг. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rsn.tomsk.ru/news/rsn/bljutang> – Загл. с экрана.
5. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China [Text] / P. D. Kirkland, N. Zhang, R. A. Hawkes [et al.] // Epidemiol. Infect. – 2002. – Vol. 128, N. 2. – P. 257-263.
6. Seroprevalence of Bluetongue Virus Infection in Sheep in East-Azərbayjan Province in Iran [Text] / A. Hasanpour, F. Mosakhani, H. Mirzaii, S. Mostofi // Research Journal of Biological Sciences. – 2008. – № 3 (11). – P. 1265-1270.
7. Detection of antibodies against Blue tongue virus in yaks (*Bos grunniens*) in Issyk kul, first report [Text] / O. Avci, Y. Orhan, B. Oya [et al.] // J Anim Plant Sci. – 2014. – N 24(4). – P. 1220-1223
8. Serological Survey of Ruminant livestock in Kazakhstan During Post-Soviet Transitions in Farming and Disease Control [Text] / M. Lundervold, E.J. Milner-Gulland, C.J. O'Callaghan [et al.] // Acta vet. scand. – 2004. – N 45. – P. 211-224.
9. Муруева, Г. Б. Актуальность контроля блютанга овец при обеспечении продовольственной безопасности Республики Бурятия [Текст] / Г. Б. Муруева // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2011. – № 3. – С. 48-50.

10. РК ограничит импорт крупного рогатого скота. – 2014 [Электронный ресурс] / Д. Куатова. – Режим доступа: <http://kapital.kz/economic/30953/rk-ogranichit-importkrupnogo-rogatogo-skota.html>. – Загл. с экрана.
11. Кодекс здоровья наземных животных [Текст] / Всемирная организация здоровья животных. – М.: [б.и.], 2016. – Т. 1: Общие положения. – 450 с.
12. Leudke, A. J. Bluetongue in cattle: viremia [Text] / A. J. Leudke, M. M. Jochim, R. H. Jones // *Am. J. Vet Res.* – 1969. – N 30. – P. 511-516.
13. Luedke, A. J. Overwintering mechanism for bluetongue virus: biological recovery of latent virus from a bovine by bites of *Culicoides variipennis* [Text] / A. J. Luedke, R. H. Jones, T. E. Walton // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1977. – N 26. – P. 313-325.
14. Venter, GJ. *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of bluetongue virus in South Africa - a review [Text] / GJ. Venter // *Vet Ital.* – 2015. – N. 51(4). – P. 325-33.
15. Alexander, R. A. Haig D.A. The use of egg attenuated bluetongue virus in the production of a polyvalent vaccine of sheep [Text] / R. A. Alexander, D. A. Haig // *Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal. Industr.* – 1951. – № 1. – Vol. 25. – P. 3-15.
16. Cox, H. P. Living modified viruses as immunizing agents. Bluetongue [Text] / H. P. Cox // *Brit. Med. J.* – 1954. – N 7. – P. 262.
17. Foster, M. M. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus isolations from vertebrate and invertebrate host at a common geographies [Text] / M. M. Foster, H. E. Metcalf, T. L. Barber // *J. Amer. Vet. Assoc.* – 1980. – Vol. 176, N 2. – P. 126-129.
18. Noad, R. Bluetongue vaccines [Text] / R. Noad, P. Roy // *Vaccine.* – 2009. – N 27. – P. 86-89.
19. Абдураимов, Е. О. Технология производства вакцин и иммунопрофилактика чумы мелких жвачных животных и катаральной лихорадки овец [Текст]: автореф. ... д-ра вет. наук / Е. О. Абдураимов. – Бишкек, 2016. – 41 с.

20. Office International des Épizooties. Bluetongue, Chapter 2.1.9. In Manual of standards of diagnostic tests and vaccines [Text] // OIE, Paris. – 2000. – P. 153-167.
21. Возможность использования димера этиленimina для приготовления инактивированной вакцины против катаральной лихорадки овец [Текст] / В. А. Сергеев, Н. П. Ананьев-Рященко, В. П. Хижинская, Р. Б. Кошелева // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпидемиологии. – Покров, 1980. – С. 137-138.
22. Кошелева, Р. В. Инактивированная вакцина против катаральной лихорадки овец: Методы инактивации и контроля [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Р. В. Кошелева. – Покров, 1984. – 25 с.
23. Эффективность инактивированной вакцины против вируса блютанга 8-го серотипа [Текст] / В. И. Балышева, Н. И. Закутский, О. Г. Лаптева [и др.]. // Журн. ветеринария. – 2008. – № 11. – С. 20-22.
24. Сливко, В. В. Усовершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против блютанга [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В. В. Сливко. – Покров, 2003. – 25 с.
25. Нестеров, Е. А. Совершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против блютанга и оценка ее эффективности [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Е. А. Нестеров. – Покров, 2012. – 27 с.
26. Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep [Text] / M. Eschbaumer, B. Hoffmann, P. König [et. al.]. // Vaccine. – 2009. – N 27(31). – P. 4169-4175.
27. Василенко, Н. З. Инфекционная катаральная лихорадка овец [Текст] / Н. З. Василенко // Малоизвестные заразные болезни животных. – М., 1973. – С. 103-114.
28. Сюрин, В. Н. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. – М.: ВО Агропромиздат, 1991 – 528 с.

29. Терентьева, Ф. А. Болезни овец [Текст] / Ф. А. Терентьева, А. А. Маркова, М. Д. Польшковский // Сюрин В. Н. Инфекционная катаральная лихорадка овец. – М., 1963. – С. 225-232.
30. Руководство по ветеринарной вирусологии [Текст] / под ред. В. Н. Сюрин. – М.: Колос, 1966. – 687 с.
31. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных [Текст] / В. Н. Сюрин, Г. А. Иванова, Е. А. Краснобаев, Ю. В. Фомин. – М.: Колос, 1972 – 416 с.
32. Кадымов, Р. А. Катаральная лихорадка овец [Текст] / Р. А. Кадымов // Инфекционные болезни овец. – М., 1987. – С. 199-204.
33. Anonymous. New disease [Text] // Report of the South African cattle and sheep disease commission. – 1876. – Report 16:P. – P. 189-194.
34. Theiler, A. Bluetongue in sheep [Text] / A. Theiler // Annual Report. – 1906. – P.115-121.
35. Gutche, T. There was a man. Timmins [Text] / T. Gutche // Cape Town. – 1979. – P. 4.
36. Hutcheon, D. Malarial catarrhal fever of sheep [Text] / D. Hutcheon // Vet. Rec. – 1902. – 14. – P. 629-633.
37. Roy, P. Bluetongue Viruses [Text] / P. Roy, B. M. Gorman // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 1990. – P.1-15.
38. Spreull, J. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa [Text] / J. Spreull // J Comp Pathol Ther. – 1905. – N 18. – P. 321-337.
39. Эпизоотология и меры борьбы с блютангом [Текст] / А. А. Стрижаков, Н. И. Закутский, А. А. Коломыцев, А. В. Кнize // Журн. Ветеринария. – 2008. – № 8. – С. 18-23.
40. Бакулов, И. А. Эпизоотическая ситуация в мире по особо опасным болезням животных к концу XX столетия [Текст] / И. А. Бакулов // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – С. 11-17.

41. Gómez-Tejedor, C. Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004 [Text] / C. Gómez-Tejedor // *Vet Ital.* – 2004. – N 40(3). – P. 57-60.
42. Дудникова, Н. С. Краткий обзор эпизоотической ситуации в странах Восточной, Юго-Восточной Азии и Океании по особо опасным болезням животных 2007 год [Текст]: информ.-аналит. обзор / Н. С. Дудникова, О. Н. Петрова. – Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ, 2008. – 36 с.
43. Особенности появления и распространения блютанга в европейских странах в 2006-2007 годах и риск его возникновения на территории Российской Федерации [Текст]: информ.-аналит. обзор / В. М. Захаров, В. М. Гуленкин, А. К. Караулов [и др.]. – Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ, 2007. – 44 с.
44. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa // *Virology Journal.* – 2012. – N 9:198 [Электронный ресурс] / P. Coetzee, M. Stokstad, E. H. Venter [et. al.]. – Режим доступа: <http://www.virologyj.com/content/9/1/198>. – Загл. с экрана.
45. Meiswinkel, R. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe – the entomological perspective [Text] / R. Meiswinkel, T. Baldet, W. Takken [et. al.] // *Prev Vet Med.* – 2008. – N 87. – P. 55-63.
46. Gibbs, EP. The epidemiology of bluetongue [Text] / EP. Gibbs, EC. Greiner // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* – 1994. – N17. – P. 207-220.
47. Tollersrud, T. Bluetongue - Europe (06): Norway, First Cases Detected. Archive No. 20090221.0729. Available at [Электронный ресурс] / T. Tollersrud. – Режим доступа: <http://www.promedmail.org> [accessed 02.04.2009]. – Загл. с экрана.
48. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006 [Text] / PS. Mellor, S. Carpenter, L. Harrup [et. al.] // *Prev Vet Med.* – 2008. – N 87. – P. 4-20.
49. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe [Text] / BV. Purse, PS. Mellor, DJ. Rogers [et. al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2005. – N 3. – P. 171-181.

50. Maclachlan, N.J. Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe [Text] / N.J. Maclachlan // *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* – 2010. – N 26. – P. 163-171.
51. Cox, H. P. Living modified viruses as immunizing agents. Bluetongue [Text] / H. P. Cox // *Brit. Med.J.* – 1954. – N 7. – P. 262.
52. Haig, D. A. La Fievre Catarrhale du mouton [Text] / D. A. Haig // *Bull. Off. Int. Epiz.* – 1961. – N7/8. – P. 1332-1334.
53. Howell, P. G. Some aspects of the epizootology of bluetongue [Text] / P. G. Howell // *Bull. Off. Int. Epiz.* – 1966. – N 66. – P. 341-352.
54. Бакулов, И. А. Особоопасные болезни животных [Текст]: справ. / И. А. Бакулов, В. М. Котляров // *Всесоюз. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ).* – Покров, 2002. – С. 5-10.
55. Ветеринарная вирусология [Текст]: учеб. пособие / В. А. Сергеев, Б. Г. Орлянкин, А. А. Гусев, О. И. Сухарев. – М.: Академия, 2002. – 218 с.
56. Сергеев, В. А. Катаральная лихорадка овец [Текст] / В. А. Сергеев // *Карантинные и малоизученные болезни животных.* – М., 1983. – С. 63-71.
57. Сюрин, В. Н. Ветеринарная вирусология [Текст] / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. – М.: Колос, 1984. – 376 с.
58. Лактионов, А. М. Катаральная лихорадка овец [Текст] / А. М. Лактионов // *Малоизученные заболевания сельскохозяйственных животных.* – М., 1967. – С. 82-90.
59. Wikipedia. The Free Encyclopedia [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://en.wikipedia.org/wiki/Veterinary_virology#Bluetongue_virus. – Загл. с экрана.
60. Borden, E. C. Physicochemical and Morphological Relationships of some Arthropod-borne Viruses to Bluetongue Virus- A new Taxonomic Group [Text] / E. C. Borden, R. E. Shope, F. A. Murphy // *Physicochemical and Serological Studies J. Gen. Virol.* – 1971. – N 13. – P. 261-271.

61. Svehag, SE. Sensitivity of bluetongue virus to lipid solvents, trypsin and pH changes and its serological relationship to arboviruses [Text] / SE. Svehag, Leendertsen, J. R. Gorham // *J. Hyg., Camb.* – 1966. – N 64. – P. 339.
62. Svehag, SE. Thermal inactivation of bluetongue virus [Text] / SE. Svehag // *Archiv für die gesamte Virusforschung.* – 1963. – Vol. 13, N 5. – P. 499-510.
63. Howell, P. G. Bluetongue virus [Text] / P. G. Howell, D. W. Verwoerd // *Virol. Monogr.* 1971. – P. 9.
64. Owen, NC. Investigations into the pH stability of bluetongue virus and its survival in mutton and beef [Text] / NC. Owen // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 1964. – N 31 (2). – P. 109-118.
65. Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27 // *Genome Announc.* – 2015. – N 3(2) [Электронный ресурс] / M. Jenckel, E. Bréard, C. Schulz [et al.]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4357740/>. – Загл. с экрана.
66. Huismans, H. Protein synthesis in bluetongue virus-infected cells [Text] / H. Huismans // *Virology.* – 1979. – N 92. – P. 385-396.
67. Gould, AR. The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype I RNA 3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates [Text] / AR. Gould // *Virus Res.* – 1987. – N 7. – P. 169-183.
68. Huismans, H. A comparison of different cloned bluetongue virus genome segments as probes for the detection of virus-specified RNA [Text] / H. Huismans, M. Cloete // *Virology.* – 1987. – N 158. – P. 373-380.
69. Mertens, PPC. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type I to the proteins which they encode [Text] / PPC. Mertens, F. Brown, DV. Sangar // *Virology.* – 1984. – N 135. – P. 207-217.
70. Van Dijk, AA. In vitro transcription and translation of bluetongue virus mRNA [Text] / AA. Van Dijk, H. Huismans // *J Gen Virol.* – 1988. – N 69. – P. 573-581.

71. Huismans, H. Bluetongue Virus Structural Components. Current Topics in Microbiology and Immunology [Text] / H. Huismans, A. A. Van Dijk // Springer. – 1990. – P. 21-37.
72. Макаров, В. В. Мокрецы рода *Culicoides* — эмерджентные векторы блютанга в Европе [Текст] / В. В. Макаров, Ф. И. Василевич, О. И. Сухарев // Рос. вет. журн. с.-х. животные. – 2014. – № 2. – С. 29-35.
73. Мониторинг блютанга у животных, импортированных из стран ЕС [Текст] / С. Ж. Цыбанов, Д. В. Колбасов, А. В. Луницын [и др.]. // Журн. ветеринария. – 2008. – № 10. – С. 25-27.
74. Бакулов, И. А. Эпизоотическая ситуация в мире по особо опасным болезням животных к концу XX столетия [Текст] / И. А. Бакулов // Материалы междунар. науч.-практ. конф. 15-16 авг. 2000 г., г. Покров. – Покров, 2000. – С. 11-17.
75. Анализ эпизоотической ситуации по катаральной лихорадке овец [Текст] / А. А. Коломыщев, В. И. Балышева, А. В. Книзе [и др.]. // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – С. 126-128.
76. Блютанг и блютангоподобные болезни в начале XXI в.: Эпизоотологические исследования и анализ [Текст] / В. В. Макаров, Шоопала Джоханнес, С. И. Джупина, О. И. Сухарев // Вестн. РУДН. Сер.: Агрономия и животноводство. – 2013. – № 1. – С. 44-59.
77. Макаров, В. В. Трансмиссивные экзотические инфекции животных на неэндемичных территориях [Текст] / В. В. Макаров // Пест-менеджмент. – 2012. – № 2. – С. 17-30.
78. Макаров, В. В. Блютанг и блютангоподобные болезни на неэндемичных территориях [Текст] / В. В. Макаров, В. А. Мищенко, О. И. Сухарев // Ветеринар. практика. – 2012. – № 2. – С. 12-19.
79. Tabachnick, W. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus [Text] / W. Tabachnick // Vet. Ital. – 2004. – N 40. – P. 145-150.

80. Wilson A. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change [Text] / A. Wilson, P. Mellor // Parasitol. Res. – 2008. – N 103. – P. 69-77.
81. Anthony, J. Bluetongue in Europe: past, present and future [Text] / Anthony J. Wilson, Philip S. Mellor // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2009. – N 364. – P. 2669-2681.
82. Geering, WA. Control of bluetongue in an epizootic situation: Australian plans [Text] / WA. Geering // Aust Vet J. – 1975. – N 51(4). – P. 220-32.
83. Romero, LJ. The experience with BTV vaccination in Spain. International workshop bluetongue vaccines 19 February 2013, Strasbourg, France [Электронный ресурс] / LJ. Romero. – Режим доступа: https://www.edqm.eu/.../abstracts_bluetongue_vaccines.pdf/. – Загл. с экрана.
84. International animal health code [Text] / Office International des Epizooties. – Ninth edition, 2000. – 473 p.
85. Terrestrial animal health code [Text] / WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. – Twentieth edition, 2011. – Vol. 1: General provisions. – 397 p.
86. European Council. Council Directive 2000/75/EC of 20 November 2000 laying down specific provisions for the control and eradication of bluetongue [Text] Off J, L 327, 22.12.2000. – P.74-83.
87. Caporale, V. Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine [Text] / V. Caporale // A critical review – Conf. OIE., 2008. – P. 189-207.
88. Haig, D. A. Bluetongue. Proc. 16th [Text] / D. A. Haig // Int. vet. Congr. Madrid. – 1959. – P. 215-225.
89. Lopez, A. C. Epizootic ovine en Espande (bluetongue) [Text] / A. C. Lopez, C. S. Botija // Bull.Off.Int.Epiz. – 1958. – N 50. – P. 65-93.
90. Howell, PG. The antigenic classification and distribution of naturally occurring strains of bluetongue virus [Text] / PG. Howell // J.S. Afr. Vet. Med. Assoc. – 1970. – Vol. 41 – P. 215-223.

91. Howell, PG. The antigenic classification of strains of bluetongue virus, their significance and use in prophylactic immunization [Text]: D.V.Sc. thesis / PG. Howell. – Univer. of Pretoria. – 1969.
92. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – М.: Колос, 1998. – 928 с.
93. MacLachlan, NJ. Bluetongue: a review and global overview of the only OIE list A disease that is endemic in North America. In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). American College of Veterinary Pathologists & American Society of Veterinary Clinical Pathology (Eds). International Veterinary Information Service, NY, USA 1–5 (2004) [Электронный ресурс] / NJ. MacLachlan. – Режим доступа: https://www.researchgate.net/.../265869372_Bluetongue_A_. – Загл. с экрана.
94. California Wool Growers Association [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.woolgrowers.org. – Загл. с экрана.
95. McConnell, S. Use of a quadrivalent modified-live bluetongue virus vaccine in wildlife species [Text] / S. McConnell, JC. Morrill, Jr. Livingston CW // Prog. Clin. Biol. Res. – 1985. – N 178. – P. 631-638.
96. Jeggo, MH. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types [Text] / MH. Jeggo, ID. Gumm, WP. Taylor // Res. Vet. Sci. – 1983. – N 34(2). – P. 205-211.
97. Laboratory evaluation of a living attenuated vaccine against bluetongue type 20 virus [Text] / MC. Wark, MB. Shepherd-Clark, HV. Smith, WD. Collins // Aust. Vet. J. – 1982. – N 59(1). – P. 6-10.
98. Bluetongue vaccines: the past, present and future [Text] / V. Bhanuprakash, BK. Indrani, M. Hosamani [et al.] // Expert Rev. Vaccines. – 2009. – N 8(2). – P. 191-204.
99. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity [Text] / I. Schwartz-Cornil, PP. Mertens, V. Contrera [et al.] // Vet. Res. – 2008. – N 39(5). – P. 39-46.

100. Bowne, J. G. Bluetongue of sheep and cattle: past, present and future [Text] / J. G. Bowne, A. J. Luedke, M. M. Jochim // J. Am. vet. med. Ass. – 1967. – N151. – P. 1801-1803.

101. Development of inactivated vaccines for bluetongue in China [Text] / Li-ZhiHua, Peng-KeGao, Zhang-KhaiLi [et al.] // Bluetongue disease in Southeast Asia and the Pacific: Proceedings of the First Southeast Asia and Pacific Regional Bluetongue Symposium, Greenlake Hotel, Kunming, P.R. China. – 1996. – N 13. – P. 227-230.

102. Parker, J. An experimental inactivated vaccine against bluetongue [Text] / J. Parker, K.A.J. Hernimann, E.P.J. Gibbs // Vet. Rec. – 1975. – N 96. – P. 284-287.

103. Parsonson, I. M. Experimentally induced infection with bluetongue vims serotype 11 in cows [Text] / I. M. Parsonson, L. H. Thompson, T. E. Walton // American-Journal-of-Veterinary-Research. – 1994. – Vol. 55, № 2. – P. 1529-1534.

104. Di Emidio, B. Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2 [Text] / B. Di Emidio // Veterinaria Italiana. – 2004. – N 40(4). – P. 640-644.

105. Immune response and protective efficacy in sheep immunized with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine [Text] / M. A. Ramakrishan, A. B. Pandey, K. P. Singh [et al.] // Veterinaria Italiana. – 2005. – N 41(3). – P. 149-155.

106. Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2. [Text] / V. Caporale, B. Emidio, P. di Nicolussi [et al.] // Vet. Ital. – 2004. – N 40(4). – P. 640-644.

107. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle [Text] / G. Savini, C. Hamers, A. Conte [et al.] // Vet. Microbiol. – 2009. – N 133(1/2). – P. 1-8.

108. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy [Text] / G. Savini, GF. Ronchi, A. Leone [et al.] // Vet. Microbiol. – 2007. – N 124(1/2). – P. 140-146.

109. Trial of inactivated bluetongue vaccine in Bharat–Merino sheep [Text] / AB. Pandey, S. Nandi, SC. Dubey [et al.] // *J. Immunol. Immunopathol.* – 2006. – N 8(2). – P. 145-146.
110. Effect of inactivated bluetongue vaccine in two different breeds of sheep. Presented at: International Conference on Emerging and Reemerging Viral diseases of the Tropics and Sub-tropics [Text] / AB. Pandey, S. Nandi, SD. Audarya SD [et al.] // Indian Agricultural Research Institute, under the auspices of Indian Virological Society. New Delhi, India, 11–14 December 2007.
111. Inactivated bluetongue virus vaccine in lambs: differential serological responses related to breed [Text] / LJ. Berry, BI. Osburn, JL. Stott [et al.] // *Vet. Res. Commun.* – 1982. – N 5(3). – P. 289-293.
112. Potency and efficacy of inactivated bluetongue virus vaccines [Text] / DR. Stevens, J. Stott, BI. Osburn [et al.] // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1985. – N 178. – P. 649-652.
113. Studies on bluetongue disease in the People’s Republic of China [Text] / N. Zhang, Z. Li, F. Zhang, J. Zhu // *Vet. Ital.* – 2004. – N 40(3). – P. 51-56.
114. Walton, T. E. The history of bluetongue and a current global overview [Text] / T. E. Walton // *Vet. Ital.* – 2004. – N 40 (3). – P. 31-38.
115. Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT–PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. [Text] / S. Narender Maan, Sushila Maan, N. Manjunatha Belaganahalli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, Iss.2. – P.1-9.
116. The Foreign Animal Disease Preparedness and Response Plan (FAD PReP). Bluetongue: 1. [Text] // Overview of etiology and ecology. Standard Operating Procedures (SOPs) provide operational guidance for responding to an animal health emergency in the United States. – 2013. – P.1-13
117. Saegerman, C. Bluetongue Epidemiology in the European Union [Text] / C. Saegerman, D. Berkvens, PS. Mellor // *Emerging Infectious Diseases.* – 2008. – Vol. 14, N 4. – P. 539-544.

118. Серологическое обследование жвачных в Бурятии через семь лет после вспышки блютанга [Текст] / А. А. Стрижаков, М. Б. Новикова, С. Ж. Цыбанов, Г. Б. Мурева // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: Междунар. практ. конф. – Покров, 2000. – С. 63-64.
119. Complete Genomic Sequence of Bluetongue Virus Serotype 16 from China [Text] / T. Yang, N. Liu, Q. Xu [et al.] // Journal of virology. – 2011. – P. 134-72.
120. Complete Genomic Sequence of Bluetongue Virus Serotype 1 from China [Text] / T. Yang, N. Liu, Q. Xu [et al.] // J. Virol. – 2012. – N 86(2). – P. 12-88.
121. Complete genome sequence of the first bluetongue virus serotype 7 isolate from China: evidence for entry of African-lineage strains and reassortment between the introduced and native strains [Text] / H. Yang, M. Lv, M. Sun [et al.]. // MArch Virol. – 2015. – Oct 23. [Epub ahead of print]
122. Результаты мониторинга катаральной лихорадки овец в Центральной Азии и Казахстане [Текст] / Е. О. Абдураимов, Е. М. Раманкулов, С. М. Мамадалиев [и др.] // Сборник материалов междунар. науч.-практ. конф. «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней (14-15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия). – Новосибирск, 2009. – С. 49-52.
123. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины [Текст] / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Е. И. Алипер. – М.: Библионека, 2007. – 524 с.
124. Сергеев, В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных [Текст] / В. А. Сергеев. – М.: Колос, 1976. – 304 с.
125. Isolation and identification of bluetongue virus [Text] / A. Clavijo, R. A. Heckert, G. C. Dulac, A. Afshar // Journal of virological Methods. – 2000. – Vol. 87. – P.13-23.

126. Sekar, P. Optimization and Characterization of Bluetongue Virus in Embryonated Chicken Egg [Text] / P. Sekar, G. Gurusubramanian, K. Ponnuragan // *Advanced BioTech.* – 2008. – Vol. 6, Is.11. – P.12-17.

127. Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus [Text] / P. Franchi, MT. Mercante, GF. Ronchi [et al.] // *J Virol Methods.* – 2008. – P. 263-265.

128. Fernandes, M. V. Isolation and propagation of bluetongue virus in tissue culture [Text] / M. V. Fernandes // *Am. J. Vet. Res.* – 1959. – Vol. 20, N 3. – P. 398-408.

129. Чувствительность некоторых первичных культур и перевиваемых линий клеток к вирусу катаральной лихорадки овец [Текст] / А. Г. Головков, С. М. Шахбазян, К. Г. Гарибянц [и др.] // *Проблемы вирусологии и микробиологии: тез. докл. науч. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 27-му съезду КПСС.* – Покров, 1986. – Т. 1. – С. 25-26.

130. Балышева, В. И. Культивирование вируса блютанга а культурах клеток животных [Текст] / В. И. Балышева, В. В. Сливко, В. И. Жестерев // *Докл. Рос. академии с.-х. наук.* – 2002. – № 6. – С. 46-48.

131. Некоторые аспекты культивирования вируса блютанга в различных культуральных системах [Текст] / В. И. Балышева, В. В. Недосекова, Г. Н. Чурбанова [и др.] // *Международная науч.-практ. конф.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: сб. ст.* – Покров, 2000. – С.179-181.

132. Сергеев, В. А. Вирусные вакцины [Текст] / В. А. Сергеев. – Киев: Урожай, 1993. – 368 с.

133. Gard, S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means [Text] / S. Gard, S. Gard // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1960. – Vol. 83. – P. 638-648.

134. Vaccination of Macaques with Adjuvanted Formalin-Inactivated Influenza A Virus (H5N1) Vaccines: Protection against H5N1 Challenge without

Disease Enhancement [Text] / C. Ruat, C. Caillet, A. Bidaut [et al.]. // J. Virol. – 2008. – Vol. 82, No. 5. – P. 2565-2569.

135. Легконогих И.П. Влияние инактивантов на компонентный состав и свойства вируса ящура [Текст]: дис. канд. биол. наук / И.П. Легконогих – Владимир, 1984. – 126 с.

136. Михалишина, З. Я. Иммуногенность противоящурных вакцин концентрированных сорбцией и замораживанием [Текст] / З. Я. Михалишина, В. В. Михалишин, Л. Н. Шубин // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докл. науч. конф. ВНИЯИ. – Владимир, 1983. – С. 66-67.

137. Lei, J. C. Long-term storage of concentrated immunogen in foot-and-mouth disease production [Text] / J. C. Lei, Mc. Kercher // Mtg. Europ. Comm. Control FMD Lindholm, Denmark. – 1979. – P. 24-41.

138. Immunisation des jeunes bovins contre la fièvre aphteuse à l'aide de vaccins en adjuvants huileux et aqueux [Text] / H. Favre, A. Brun, C. Buret [et al.] // Bull. Off. Int. Epizoot. – 1978. – Vol. 89, № 11/12. – P. 967-985.

139. Хлыбова, Т.В. Экспериментальные исследования по разработке метода приготовления инактивированной вакцины против КЛЮ [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Т. В. Хлыбова. – пгт. Гвардейский, 1974. – 23 с.

140. Кравченко, А. А. Кинетика инактивации вируса ящура формальдегидом [Текст] / А. А. Кравченко, Е. Е. Никитин // Ящур: темат. сб. науч. работ. – Владимир, 1970. – Т. 1. – С. 124-129.

141. Garnier, R. Formaldehyde toxicity. A review [Text] / R. Garnier, X. Rousselin, N. Rosenberg // Inst. Nat. Rech. Stcur. – 1989. – N 134. – P. 63-85.

142. Card, S. Inactivation of poliovirus by formaldehyde. Analyses of inactivation curve [Text] / S. Card, E. Lycke // Arch. Ges. Virusforsch. – 1957. – N 7. – P.471-482.

143. Appleton, G. S. A comparison of the immune response of chickens vaccinated with formalin and beta propiolactone inactivated Newcastle disease

vaccine [Text] / G. S. Appleton, S. B. Hitichnes, R. W. Winterfield // Amer. J. Vet. Res. – 1963. – № 24. – P. 827-831.

144. Dermer, O. Ethyleneimine and other Aziridines [Text] / O. Dermer, G. Ham // Acad. Press. New York. – 1969. – P. 65-68.

145. Bahnemann, H. G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production [Text] / H. G. Bahnemann // Arch.Virol. – 1975. – Vol. 47. – P. 47-56.

146. Preliminary studies on the development of a swine vesicular disease vaccine [Text] / G. N. Mowat, M. J. Prince, R. E. Spier, R. F. Staple // Arch. Ges. Virus-forsch. – 1974. – Vol. 44. – P. 350-360.

147. Кусаинов, А. К. Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против гриппа лошадей [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 04.03.99 / А. К. Кусаинов. – п.г.т. Гвардейский, 1999. – 25 с.

148. Miller, J. M. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies [Text] / J. M. Miller, M. J. Van Der Maaten // Eur J Cancer. – 1977. – Vol. 13. – P. 1369-1375.

149. Чистова, З. Я. Изучение иммуногенной активности инактивированной ДЭИ-ГОА-сапонин вакциной против инфекционного бронхита кур в производственных условиях [Текст] / З. Я. Чистова // Проблемы молекулярной биологии и патологии: сб. науч. тр. МВА. – М., 1977. – Т. 93. – С. 74-76.

150. Табынов, К. К. Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против гриппа птиц [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук / К. К. Табынов. – Алматы, 2010. – 21 с.

151. Борисова И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц [Text]: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Борисова И.А. – Владимир, 2008. – 25 с.

152. Воробьев, А. А. Адьюванты (неспецифические стимуляторы I иммуногенеза) [Текст] / А. А. Воробьев, М. М. Васильев. – М.: Медицина, 1969. – 206 с.
153. Учитель, И. Я. Механизм действия адьювантов [Текст] / И. Я. Учитель // Адьюванты в вакцинно-сывороточном деле: тез. докл. – М., 1975. – С. 123-125.
154. Медуницын, Н. В. Вакцинология [Текст] / Н. В. Медуницын. – М.: Триада-Х, 1999. – 272 с.
155. Чумаков, М. П. Природный сапонин [Текст] / М. П. Чумаков // Вестн. АМН СССР. – 1980. – № 12. – С. 71.
156. Чумаков, М. П. Свойства сапонины [Текст] / М. П. Чумаков // Вопросы вирусологии. – 1984. – № 6. – С. 701.
157. Чумаков, М. П. Химическая структура сапонины [Текст] / М. П. Чумаков [и др.] // Вестн. акад. мед. наук СССР. – 1989. – № 3. – С. 23.
158. Михалишин, В. В. Адьюванты и их использование [Текст] / В. В. Михалишин, Н. С. Мамков // Труды федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. – Т. 6. – С. 340-371.
159. Aucouturier, J. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines [Text] / J. Aucouturier, L. Dupuis, V. Ganne // Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 2666-2672.
160. Михалишин, В. В., Мамков Н.С. Адьюванты и их использование [Текст] / В. В. Михалишин, Н. С. Мамков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. – Т. 6. – С. 340-371.
161. Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant (Montanide ISA 720) [Text] / A. A. Scalzo, S. L. Elliott, J. Cox [et al.] // J. Virol. – 1995. – Vol. 69. – P. 2567-2572.
162. Niedbalski, W. Bluetongue vaccines in Europe [Text] / W. Niedbalski // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2011. – Vol. 14, N 2. – P. 299-304.

163. Noad, R. Bluetongue vaccines [Text] / R. Noad, P. Roy // Vaccine. –2009. – N 27. – P. 86-89.

164. Изучение культуральных свойств вируса катаральной лихорадки овец, выделенного в республике Таджикистан [Text] / Е. О. Абдураимов, Ж. К. Кошематов, З. Д. Ершебулов, С. Ш. Нурабаев // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы, 2008. – С. 34-36.

165. Самуйленко, А. Я. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов [Текст] / А. Я. Самуйленко, Е. А. Рубан. – М., 2000. – Т. 1. – С. 190-241.

166. Культивирование перевиваемых клеток ПСГК-60 и гибридных клеток SS-3 в альгинат-хитозановых микрокапсулах [Текст] / В. И. Жестерев, Е. А. Марквичева, И. С. Черняева [и др.] // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: тр. Междунар. научн.-практ. конф. – Покров, 2003. – Ч. 2.1. – С. 553.

167. Биотехнология [Текст] / под ред. Е. С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.

168. Инструкция по содержанию подопытных животных и ветеринарно-санитарным правилам в экспериментально-биологических изоляторах [Текст]: утв. директором НИСХИ, инв. № 1069.

169. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных [Текст]: справ. / А. П. Калашников, В. И. Фисинина, В. В. Щеглова, Н. И. Клейменова. – М.: Россельхозакадемия, 2003. – 456 с.

170. Вихревой биореактор «БИОК». I. Опыт культивирования штамма E.coli BL21 (DE3) pZZSA, продуцирующего рекомбинантный ангионин человека [Текст] / В. Кислых, Ю. Рамазанов, В. Майстренко, Н. П. Мертвецов // Биотехнология. – 2000. – № 4. – С.72-79.

171. Культивирование вируса клещевого энцефалита в биореакторе с газовихревым перемешиванием [Электронный ресурс] / Н. В. Бакулева, В. В.

Щурихина, О. И. Шарова, Н. С. Шквыря. – Режим доступа: www.cbio.ru/v5/modules/news. 16.11.2015г. – Загл. с экрана.

172. Миронова, Л. Л. Аппаратурное оформление репродукции вакцинных штаммов полиовируса в псевдосуспензионной культуре [Текст] / Л. Л. Миронова, В. Д. Попова, О. И. Конюшко // Биотехнология. – 1997. – № 6. – С. 60-62.

173. Определение оптимальных параметров культивирования вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Д. С. Таранов, Е. О. Абдураимов, С. М. Мамадалиев [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – № 4. – С. 88.

174. Reed, I. J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / I. J. Reed, H. A. Muench // Am. J. Hyg. – 1938. – N. 27. – P. 493-497.

175. Эмануэль, Н. М. Курс химической кинетики [Текст] / Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре. – М.: Наука, 1969. – 370 с.

176. Seppic Vaccine Adjuvants for Poultry [Text] / L. Dupuis, S. Ascarateil, J. Aucouturier, V. Ganne // Digital Object Identifier. – 2003. – Vol. 122. – P.1373-79.

177. Реактогенные и иммуногенные свойства поливакцин против катаральной лихорадки овец [Текст] / В. А. Сергеев, Н. З. Василенко, Г. Г. Валиашвили [и др.] // Материалы науч.-теорет. конф. 16-18 марта ВНИИВиМ. – М., 1981. – С. 97-99.

178. Сюрин, В. Н. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. – М.: ВО Агропромиздат, 1991. – 524 с.

179. Gupta, RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants [Text] / RK. Gupta // Adv Drug Deliv Rev. – 1998. – N 32. – P. 155-172.

180. An entomological perspective toward control [Text] / R. H. Jones, A. J. Luedke, T. E. Walton, H. E. Metcalf // World Anim. Rev. – 1981. – N 38. – P. 2-8.

181. A Two Year BTV-8 Vaccination Follow Up: Molecular Diagnostics and Assessment of Humoral and Cellular Immune Reactions [Text] / H. Alexandra, G. Nicole, S. L. Carola [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2012. – N 154. – P. 247-256.

182. Oura, C. A. L. Evaluation of the humoral immune response in adult dairy cattle three years after vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine [Text] / C. A. L. Oura, L. Edwards, C. A. Batten // *Vaccine*. – 2012. – N 30(2). – P.112-115.

183. Neutralising antibody responses in cattle and sheep following booster vaccination with two commercial inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccines [Text] / DJ. Bartram, L. Heasman, CA. Batten [et al.] // *Vet J*. – 2011. – N 188(2). – P. 193-196.

184. A One-year Follow-up of Antibody Response in Cattle and Sheep after Vaccination with Serotype 8- and Serotype 1-inactivated BT Vaccines [Text] / G. Zanella, E. Bréard, C. Sailleau [et al.] // *Transbound Emerg Dis*. – 2014. – N 61. – P. 473-476.

185. Блютанг: распространение, морфология, диагностика и специфическая профилактика [Текст] / О. В. Кухаркина, О. А. Борисова, Т. В. Жбанова, И. А. Борисова // *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 40-49.

186. Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXCL10 chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. [Text] / K. Nakamichi, S. Inoue, T. Takasaki [et al.] // *J Virol*. – 2004. – N 78(17) – P. 9376-88.

187. Garcia, L. Comparative study of bluetongue virus serotype 8 production on BHK-21 cells in a 50L Biostat® STR single-use bioreactors vs roller bottles [Text] / L. Garcia, M. Mouriño, A. Urniza // *BMC Proceedings*. – 2013. – 7(Suppl 6). – P. 83.

188. Селиверстов, А. В. Инактивация вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «К-58» [Текст] / А. В. Селиверстов, А. В. Борисов, В. Н. Кузнецов // *Труды федерального центра Охраны здоровья животных*. – Владимир, 2010. – Т. 8. – С. 148-155.

189. Jain, J. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide [Text] / J. Jain, C. Fernandes, V. Patravale // *AAPS Pharm Sci Tech.* – 2010. – N 11. – P. 826-831.

190. Aucouturier, J. Assessment of oil adjuvants in Newcastle disease vaccine [Text] / J. Aucouturier, V. Ganne // *Proceedings of the XX-th World Poultry congress.* – Montreal, 2000. – 128 p.

191. Lindblad, E. B. Safety Evaluation of Vaccine Adjuvants, in *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems* [Text] / E. B. Lindblad; ed M. Singh. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

192. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs [Text] / C. Macchi, P. Ballanti, Y. Cherel [et al.] // *Vaccine.* – 2005. – N 23(30). – P. 3999-4004.

193. Protective duration of immunity of an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep [Text] / C. Hamers, S. Rehbein, P. Hudelet [et al.] // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 11, N 27(21). – P. 2789-93.

194. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments [Text] / J.F. Toussaint, C. Sailleau, E. Breard, S. Zientara, K. De Clercq // *J Virol Methods* – 2007. – N140. P.115–123.

195. Femke Feenstra & Piet A. van Rijn (2017) Current and next-generation bluetongue vaccines: Requirements, strategies, and prospects for different field situations, *Critical Reviews in Microbiology*, 43:2, 142-155, DOI: 10.1080/1040841X.2016.1186005

196. Получение вируса блутанга в культурах клеток ВНК-21/17 и EL-4 суспензионным методом [Text] / К.Д. Жугунисов, А.Т. Жунушов, З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, Ж.Б. Кондибаева, Е.А. Булатов, Е.О. Абдураимов // *Известия НАН КР* – 2017. – №1. С.17–21.

197. Жугунисов К.Д., Жунушов А.Т. Совершенствование режима инактивации вируса блутанга бета-пропиолактоном [Text] / К.Д. Жугунисов, А.Т. Жунушов // *Известия НАН КР* – 2017. – №2. С.35–40.

198. Сравнительная оценка эффективности различных адъювантов при изготовлении инактивированной вакцины против блутанга [Text] / К.Д. Жугунисов, А.Т. Жунушов, З.Д. Ершебулов, Е.О. Абдураимов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2017. – №3. С.31–37.

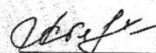
199. Безопасность и иммуногенность живой аттенуированной бивалентной вакцины против блютанга на мышах и овцах [Text] / Е.О. Абдураимов, З.Д. Ершебулов, К.Д. Жугунисов, Д.С. Таранов, Ж.К. Кошематов, Ж.Б. Кондибаева, Е.А. Булатов, К.Б. Баракбаев // Вестник КрасГАУ. – 2016. – №3. С.162–171.

Министерство образования и науки Республики Казахстан
Комитет науки
РГП НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПРОБЛЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
(НИИПББ)

УДК 602.68:619:616.9
№ госрегистрации 0109РК00450
Код МРНТИ 62.41.99,68.41.41
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор РГП НИИПББ
КН МОН РК д-р вет. наук, профессор


"28" "X" 2011 г.

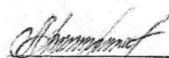
ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

НТП О.0493 "Разработка и использование генно-инженерных и клеточных технологий в
медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, пищевой и перерабатывающей
промышленности" на 2009-2011 годы

по теме:

"Разработка высокоэффективных средств профилактики и диагностики
катаральной лихорадки овец"
(заключительный)
шифр 03.01.03

Руководители темы:
Главный технолог,
канд. вет. наук

 Е.О. Абдураимов

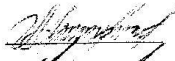
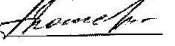
Заведующий лабораторией,
канд. биол. наук

 Ж.К. Кошметов


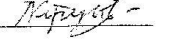
Гвардейский 2011

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

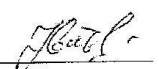
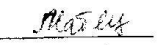
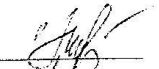
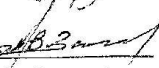
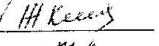
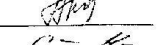
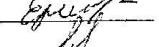


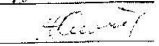
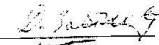
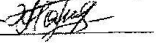

Руководители темы:

Главный технолог, канд. вет. наук		Е.О. Абдураимов (раздел (ы) 1, 3)
Заведующий лабораторией, канд. биол. наук		Ж.К. Кошеметов (раздел (ы) 1, 3)

Ответственные исполнители:

Ст. науч. сотр.		С.Ш. Нурабаев (раздел (ы) 2,3)
Мл.науч. сотр.		К.Д. Жугунисов (раздел (ы) 2,3)

Исполнители:

Заведующий лабораторией, канд. вет. наук		К.Б. Баракбаев (раздел (ы) 3)
Вед.науч. сотр., канд. биол. наук		В.М.Матвеева (раздел (ы) 3)
Заведующий лабораторией, канд. биол. наук		А.К. Наханов (раздел (ы) 2.2.1, 2.2.2)
Вед.науч. сотр., канд. биол. наук		В.И.Зайцев (раздел (ы) 2.2.17, 3.6)
Ст. науч. сотр.		Ж.Б. Кондибаева (раздел (ы) 2)
Ст. науч. сотр.		А.Ж. Ажибаев (раздел (ы) 3)
Науч. сотр.		З.Д. Ершебулов (раздел (ы) 2, 3)
Мл.науч. сотр.		М.И. Корягина (раздел (ы) 2, 3)
Мл.науч. сотр.		Д.С. Таранов (раздел (ы) 2, 3)
Ст. лаборант		Г.Д. Сугирбаева (раздел (ы) 2)
Ст. лаборант		Ж.Ж. Саметова (раздел (ы)2, 3)
Ст. лаборант		Д.Б. Зайнеттинова (раздел (ы) 2)
Ст. лаборант		Ж.Т. Аманова (раздел (ы) 2)

Министерство образования и науки Республики Казахстан
Комитет науки

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
(РГП НИИПББ КН МОН РК)

УДК 602.68:619:616.9
№ госрегистрации 0112 РК00306
Инв. №



УТВЕРЖАЮ
Директор РГП НИИПББ
д-р вет. наук, профессор,
А.Р. Сансызбай
2014 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ БИВАЛЕНТНОЙ
КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ
(заключительный)

Руководители темы
Главный ученый секретарь,
канд. вет. наук





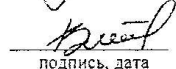



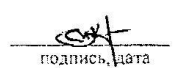


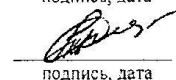
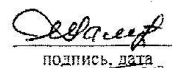
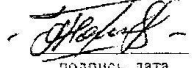
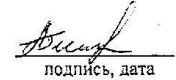
Е.О. Абдураимов

Заведующий лабораторией,
канд. вет. наук

К.Б. Баракбаев

Гвардейский 2014

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

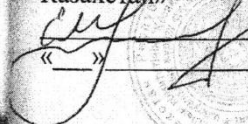

Руководители темы:		
Гл. ученый секретарь, канд. вет. наук	 подпись, дата	Е.О. Абдураимов (введение)
Зав. лаб., канд. вет. наук	 подпись, дата	К.Б. Баракбаев (заключение)
Ответственный исполнитель		
Научный сотрудник	 подпись, дата	З.Д. Ершебулов (раздел 2, 3)
Научный консультант		
Генеральный директор НИИПББ д-р вет. наук, профессор	 подпись, дата	А.Р. Сансызбай (введение, раздел 1)
Исполнители:		
Зав. лаб., канд. биол. наук	 подпись, дата	Е.А. Булатов (обобщение и оценка результатов исследований)
Зав. лаб., канд. биол. наук	 подпись, дата	Ж.К. Кошметов (раздел 3, 6)
Зав. лаб., канд. биол. наук	 подпись, дата	К.Т. Султанкулова (раздел 3, 4)
Зав. лаб., канд. биол. наук	 подпись, дата	А.К. Наханов (раздел 2.1.2)
Зав. лаб., канд. вет. наук	 подпись, дата	М.М. Касенов (раздел 3)
Ст. науч. сотр.	 подпись, дата	Ж.Б. Кондибаева (раздел 2)
Науч. сотр.	 подпись, дата	К.Д. Жугунисов (раздел 3)
Науч. сотр.	 подпись, дата	Д.С. Таранов (раздел 3)
Ст. лаборант	 подпись, дата	Ж.Ж. Саметова (раздел 2)
Ст. лаборант	 подпись, дата	Ж.Т. Аманова (раздел 2)
Нормоконтролер	 подпись, дата	Г.А. Абилдаева

Республиканское государственное предприятие «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан» Министерства образования и науки Республики Казахстан
Дочернее государственное предприятие «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»

УДК 578.3:619:616

СОГЛАСОВАНО

Председатель Научно-технического совета по НТП Ц.0382 «Национального центра биотехнологии Республики Казахстан»


« »


Е.М.Раманкулов
2008 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЦП НИИПББ
Р.И.ИИ. РК МОН РК




Г.М.Мамадалиев
2008 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

по суспензионному культивированию
вируса катаральной лихорадки овец (Bluetongue)

Гвардейский, 2008

Разработчики:

Заведующий лабораторией
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
кандидат ветеринарных наук
Абдураимов Е.О. Абдураимов
"28" октября 2008 г.

Младший научный сотрудник
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
Ершебулов З.Ж. Ершебулов
"28" октября 2008 г.

Младший научный сотрудник
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
Таранов Д.С. Таранов
"28" октября 2008 г.

Младший научный сотрудник
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
Кулманбетов К.Д. Кулманбетов
"28" октября 2008 г.

Младший научный сотрудник
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
Жугунисов К.Д. Жугунисов
"28" октября 2008 г.

Старший лаборант
ДГП НИИПБВ РГП НЦБ РК МОН РК
Саметова Ж.Ж. Саметова
"28" октября 2008 г.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

№ 63210

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что Жугунисов Куандык Даулетбаевич

и Мамадалиев Сейдигалбар Мамадалиевич; Абдураимов Ергали Орынбасарович; Ершебулов Закир Джаппарович; Кулманбетов Куат Датенбаевич; Таранов Дмитрий Сергеевич; Хайруллин Берик Мухитович

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 22259

(54) Способ приготовления вакцины против катаральной лихорадки овец

(73) *Патентообладатель:* Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(21) 2008/1213.1

(22) 06.11.2008

Председатель Комитета по правам
интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



Н.Е. Абдрахим
Н.Е. Абдрахим

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

№ 63307

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что Жугунисов Куандык Даулетбаевич

и Мамадалиев Сейдигапбар Мамадалиевич; Абдураимов Ергали Орынбасарович; Ершебулов Закир Джаппарович; Кулманбетов Куат Датенбаевич; Таранов Дмитрий Сергеевич; Саметова Жанна Жумабековна; Кипшакбаева Назым Бейсехановна

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 22285

(54) Способ суспензионного культивирования вируса катаральной лихорадки овец

(73) *Патентообладатель:* Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(21) 2008/1212.1

(22) 06.11.2008

Председатель Комитета по правам
интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



Н.Е. Абдрахим

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

№ 71197

АВТОРДЫҢ ҚУӘЛІГІ

ЗАҢ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что Жугунисов Куандык Даулетбаевич

и Мамадалиев Сейдиганбар Мамадалиевич; Абдураимов Ергали Орынбасарович; Ершебулов Закир Джашпарович; Тарапов Дмитрий Сергеевич; Кошеметов Жумагали Каукарбаевич; Нурабаев Сергазы Шуратбаевич; Ажибаев Азамат Жасуланович

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 24882

(54) Способ культивирования вируса катаральной лихорадки овец роллерным методом

(73) *Патентообладатель:* Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(21) 2010/1402.1

(22) 15.11.2010

Председатель Комитета
по правам интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



Абдрахим Н.Е.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

№ 75814

АВТОРДЫҢ ҚУӘЛІГІ

ЗАҢ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что Жугунисов Куандык Даулетбаевич

и Абдураимов Ергали Орынбасарович; Баракбаев Кайнар Базаркулович; Ершебулов Закир Джапарович; Таранов Дмитрий Сергеевич

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 26355

(54) Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной моновалентной против катаральной лихорадки овец

(73) *Патентообладатель:* Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(21) 2011/0782.1

(22) 11.07.2011

Председатель Комитета
по правам интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "А. Естаев", is written over the official seal.

А. Естаев

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

№ 75809

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

ЗАҢ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что Жугунисов Куандык Даулетбаевич

и Абдураимов Ергали Орынбасарович; Баракбаев Кайнар Базаркулович; Ершебулов Закир Джапарович; Таранов Дмитрий Сергеевич

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 26354

(54) Способ изготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против катаральной лихорадки овец

(73) *Патентообладатель:* Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(21) 2011/0685.1

(22) 21.06.2011

Председатель Комитета
по правам интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



А. Естаев

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ


РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

УДК 619:615.371:578.823.2
КП ВЭД 21.20.23

МКС 11.220

СОГЛАСОВАНО
Председатель Комитета
Государственной инспекции в
агропромышленном комплексе
МСХ Республики Казахстан
С.С. Хасенов
" " 2011 г.

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
РГП «Научно-исследовательский
институт проблем биологической
безопасности» КН МОН РК
А.Р. Сансызбай
" " 2011 г.



ВАКЦИНА ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ БИВАЛЕНТНАЯ
ИНАКТИВИРОВАННАЯ ПРОТИВ
КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ

СТ 405-1919-04 ГП-070-2011

(вводится впервые)

Срок действия

с « » 2011 г.

до « » 20 г.

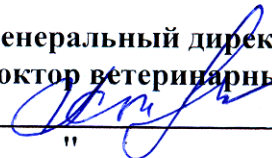
Держатель подлинника
РГП «Научно-исследовательский институт
проблем биологической безопасности»
КН МОН РК
080409, Жамбылская область
Кордайский район
п.г.т. Гвардейский

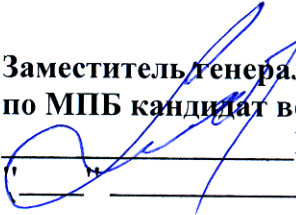
РАЗРАБОТАНО
Главный технолог РГП Научно-
исследовательского института проблем
биологической безопасности КН МОН РК
кандидат ветеринарных наук
Е.О. Абдураимов
" " 2011 г.

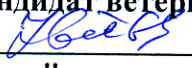
Продолжение титульного листа


РАЗРАБОТАН

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК

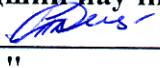
Генеральный директор
доктор ветеринарных наук, профессор

_____ А.Р. Сансызбай
" ____ " _____ 2011 г.

Заместитель генерального директора
по МПБ кандидат ветеринарных наук, доцент

_____ Б.М. Хайруллин
" ____ " _____ 2011 г.

Заведующий лабораторией
кандидат ветеринарных наук

_____ К.Б. Баракбаев
" ____ " _____ 2011 г.

Научный сотрудник

_____ З.Д. Ершебулов
" ____ " _____ 2011 г.

Младший научный сотрудник
_____ К.Д. Жугунисов
" ____ " _____ 2011 г.

Младший научный сотрудник

_____ Д.С. Таранов
" ____ " _____ 2011 г.

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан**

УДК 619:615.371:578.823.2
КП ВЭД 21.20.23

МКС 11.220

СОГЛАСОВАНО
Председатель Комитета
Государственной инспекции в
агропромышленном комплексе
МСХ Республики Казахстан

_____ С.С. Хасенов
" " _____ 2011 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
РГП «Научно-исследовательский
институт проблем биологической
безопасности» КН МОН РК

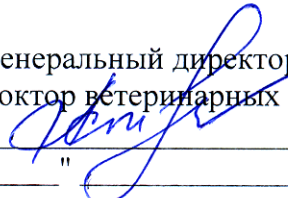


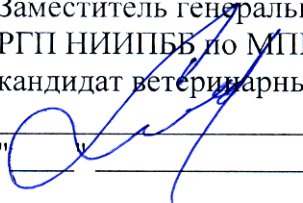
_____ А.Р. Сансызбай

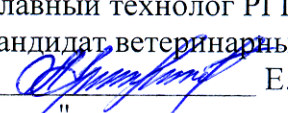
_____ 2011 г.

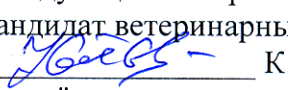
**ВРЕМЕННАЯ ИНСТРУКЦИЯ
ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ И КОНТРОЛЮ ВАКЦИНЫ
ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ БИВАЛЕНТНОЙ
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРОТИВ КАТАРАЛЬНОЙ
ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ**

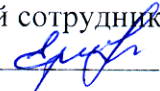
РАЗРАБОТЧИКИ:

Генеральный директор РГП НИИПББ
доктор ветеринарных наук, профессор
 А.Р. Сансызбай
" " _____ 2011 г.


Заместитель генерального директора
РГП НИИПББ по МПБ
кандидат ветеринарных наук, доцент
 Б.М. Хайруллин
" " _____ 2011 г.

Главный технолог РГП НИИПББ
кандидат ветеринарных наук
 Е.О. Абдураимов
" " _____ 2011 г.

Заведующий лабораторией РГП НИИПББ
кандидат ветеринарных наук
 К.Б. Баракбаев
" " _____ 2011 г.

Научный сотрудник РГП НИИПББ
 З.Д. Ершебулов
" " _____ 2011 г.

Младший научный сотрудник РГП НИИПББ
К.Д. Жугунисов
" " _____ 2011 г.

Младший научный сотрудник РГП НИИПББ
 Д.С. Таранов
" " _____ 2011 г.

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
БЕЗОПАСНОСТИ КН МОН РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
(РГП «НИИПБ» КН МОН РК)

УТВЕРЖДАЮ
Председатель Комитета
государственной инспекции в
агропромышленном комплексе
МСХ Республики Казахстан
_____ С.С. Хасенов
" ____ " _____ 2011 г.

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ

№ _____
г. Астана

по применению вакцины
эмульгированной бивалентной
инактивированной против
катаральной лихорадки овец

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 Вакцина инактивированная эмульгированная против катаральной лихорадки овец из штаммов «Хуросон-07/4» и «RT/RIBSP-07/16» по внешнему виду представляет собой эмульсию бледно-розоватым цветом.

1.2 Вакцину выпускают во флаконах. На флаконах с вакциной должна быть этикетка с указанием наименования предприятия-производителя; сокращенного наименования вакцины; объема вакцины, мл; номера серии; даты изготовления (месяц, год).

На упаковках с вакциной должна быть этикетка с указанием: наименования организации-производителя, юридический адрес, телефон, товарный знак (при наличии); наименование вакцины; количество флаконов в коробке; количество доз во флаконе; номер серии и номер контроля; номер государственной регистрации; дату изготовления (месяц, год); срок годности (месяц, год); условия хранения; обозначение настоящего стандарта; штриховой код (при его наличии); информацию о подтверждении соответствия (при наличии знака соответствия СТ РК 3.1); надпись: «Для ветеринарных целей». В каждую коробку должно быть вложено «Наставление по применению вакцины».

1.3 Срок годности вакцины 12 месяца со дня изготовления при условии хранения в сухом темном месте при температуре не ниже 2 °С и не выше 8 °С.

1.4 Флаконы ампулы с вакциной, содержащие посторонние примеси, с нарушенной упаковкой, без этикеток, при наличии не разбивающихся хлопьев, уничтожаются путем кипячения в течение 1 час. Места, загрязненные вакциной, подлежат обеззараживанию раствором формалина или лизола.

Утверждаю
 Генеральный директор
 РГП НИИПББ КН МОН РК
 доктор ветеринарных наук, профессор



Сансызбай А.Р.
 2011 г.

АКТ

« 03 » октябрь 2011 г. № 09-06/671-1
 пгт. Гвардейский

Проведение комиссионной проверки технологии изготовления и изучения иммунобиологических свойств инактивированной бивалентной вакцины против катаральной лихорадки овец (КЛЮ) 4 и 16 серотипов.

ОСНОВАНИЕ: Указание генерального директора НИИПББ от 06 апреля 2011 года №139/09-06

Комиссия в составе:

Председатель

комиссии:

Хайруллин Б.М. зам. генерального директора НИИПББ по МПБ.

Члены

комиссии:

Абдураимов Е.О., главный технолог НИИПББ;
 Кошеметов Ж.К., зав. лабораторией «Диагностики инфекционных заболеваний»;
 Касенова М.М., зав. лабораторией «Контроля технологии и биопрепаратов»;
 Баракбаев К.Б., зав. лабораторией «Технологии биопрепаратов»;
 Бурабаев Б.К. заведующий отделом «Биологической и санитарной безопасности»;
 Ажибаев А.Ж., старший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов»;
 Нурабаев С.Ш., старший научный сотрудник лаборатории «Диагностики инфекционных заболеваний»;
 Ершебулов З.Д., научный сотрудник лаборатории «Технологии биопрепаратов»;
 Жугунисов К.Д. младший научный сотрудник лаборатории «Технологии биопрепаратов»;
 Таранов Д.С. младший научный сотрудник лаборатории «Технологии биопрепаратов».

В период с 06 апреля по 30 сентября 2011 года провела работу по проверке технологии изготовления и изучения иммунобиологических свойств, инактивированных бивалентных сорбированной и эмульгированной вакцины против КЛЮ 4 и 16 серотипов.

Испытания проводили на базе лаборатории «Технологии биопрепаратов», «Диагностики инфекционных заболеваний», «Отдела подопытных животных» и «Вивария №5».

Заключение

В результате комиссионной проверки установлено:

1. Комиссия проверила технологию изготовления инактивированных бивалентной сорбированной и эмульгированной вакцины против КЛЮ 4 и 16 серотипов.

По предложенной технологии изготовлены инактивированные сорбированная и эмульгированная бивалентные вакцины против КЛЮ. Проверка иммунобиологических свойств показали, что вакцины соответствуют требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам для животных.

2. Инактивированные бивалентные сорбированная и эмульгированная вакцины против КЛЮ 4 и 16 серотипов стерильные и не контаминированы посторонними микроорганизмами.

3. Вакцины безвредные и авирулентные для кроликов и овец при введении в дозе 2 см^3 и 10 см^3 соответственно.

4. При двукратном введении животным с интервалом 21 сут инактивированной сорбированной бивалентной вакцины в дозе 2 см^3 защищает овец от контрольного заражения патогенным вирусом КЛЮ 4 и 16 серотипов.

5. При однократном введении животным эмульгированной бивалентной вакцины в дозе 2 см^3 через 21 суток после вакцинации защищает овец от контрольного заражения патогенным вирусом КЛЮ 4 и 16 серотипов.

6. Наличие в сыворотках крови у вакцинированных животных вируснейтрализующих антител в РН в титрах 1:4 и выше и группоспецифических антител в ТФ-ИФА в титрах 1:400 и выше защищает животных от контрольного заражения.

Протоколы комиссионных испытаний технологии изготовления и изучения иммунобиологических свойств, инактивированных бивалентных сорбированной и эмульгированной вакцины против КЛЮ 4 и 16 серотипов прилагается.

Председатель комиссии:

Хайруллин Б.М.

Члены комиссии:

Абдураимов Е.О.

Кошеметов Ж.К.

Касенов М.М.

Баракбаев К.Б.

Бурабаев Б.К.

Ажибаев А.Ж.

Нурабаев С.Ш.

Ершебулов З.Д.

Жугунисов К.Д.

Таранов Д.С.