

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ  
АКАДЕМИЯ ИМ. И.К. АХУНБАЕВА**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ  
РЕСПУБЛИКИ**

**ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Диссертационный совет Д 03.17.558

На правах рукописи  
УДК 578.823.2

**Жугунисов Куандык Даулетбаевич**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ И  
ТЕХНОЛОГИИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЛУТАНГА**

03.01.06 – биотехнология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

**Бишкек – 2019**

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

**Научный руководитель:** директор Института биотехнологии НАН КР,  
член-корр. НАН КР,  
доктор ветеринарных наук, профессор  
**Жунушов Асанкадыр Темирбекович**

**Официальные оппоненты:** зав. каф. биотехнологии и пищевой  
безопасности Казахского национального  
аграрного университета, г. Алматы,  
доктор биологических наук, профессор  
**Серикбаева Асия Демеухановна**

старший научный сотрудник лаборатории  
вирусологии и биотехнологии Кыргызского  
НИИ ветеринарии им. А. Дуйшеева,  
кандидат биологических наук,  
**Нургазиева Асель Рысбековна**

**Ведущая организация:** РГП на ПХВ "Национальный центр биотехнологии"  
Комитета науки МОН Республики Казахстан (Кургальжинское шоссе, здание  
13/5, г. Астана, 010000, Республика Казахстан).

Защита диссертации состоится 24 мая 2019 г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 03.17.558 при Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева и Институте биотехнологии НАН КР по адресу: 720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева, 720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева 92 (<http://kgma.kg>) и библиотеке НАН КР, 720071, г. Бишкек, проспект Чуй, 265.

Код доступа к онлайн защите диссертации в ZOOM webinar 8607586340.

**Ученый секретарь**  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук, доцент

**Сабирава Т.С.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Блутанг (катаральная лихорадка овец) – трансмиссивная, вирусная инфекция жвачных животных, которая передается кровососущими москитами рода *Culicoides*. Это заболевание представляет собой значительную социально-экономическую проблему в сфере международной торговли животными и животноводческими продуктами. (Jasquot M. et all, 2017, Кухаркина О.В. и др., 2010).

Блутанг (БТ) регистрируется во многих странах мира, в том числе в России и Китае (Луницын Ф.В. 2008, Kirkland, P.D. et all. 2002). В последние годы также обнаружены серопозитивные животные в Кыргызстане, Казахстане и Монголии (Avcı O et all. 2014, Lundervold M. 2004, Муруева Г.Б. 2011).

В межэпизоотический период естественным резервуаром для вируса блутанга (ВБТ) являются КРС, а также дикие жвачные животные и домашние козы (Luedke, A.J. et all. 1969, Luedke, A.J. 1977). Основными переносчиками вируса являются мелкие кровососущие семейства мокрецов, относящихся к компонентам гнуса (Venter GJ. et all. 2015). Данный фактор определяет природно-очаговый характер заболевания. Высокая температура окружающей среды и повышенная влажность, является фактором массового лета насекомых и заражением восприимчивых животных (Jasquot M. et all, 2017).

Поэтому, для предотвращения дальнейшего распространения БТ одним из наиболее важных и сложных вопросов в системе противоэпизоотических мероприятий, является специфическая профилактика у восприимчивых животных.

Для профилактики БТ разработаны различные типы живых вакцин, приготовленных из аттенуированных штаммов (Alexander R.A. et all. 1951, Cox H.P. et all. 1954). Однако, несмотря на высокую эффективность живых вакцин, их не рекомендуют применять в неблагополучных по БТ странах, так как вакцинные штаммы при пассировании через организм переносчиков могут ревертировать и приобретать патогенную форму, вызывая при этом тяжелые формы заболевания (Foster M.M. et all. 1980). Поэтому использование инактивированных вакцин считается более безопасным и практикуется во многих европейских странах для контроля вспышек, снижения вирусемии и циркуляции вирусов (Noad R. et all, 2009).

В НИИПББ была разработана вакцина против ВБТ 4 и 16 серотипов. Однако данный препарат предназначен только для овец, где продолжительность иммунитета у вакцинированных животных составляет шесть месяцев (Абдураимов Е.О., 2016). В соответствии с требованиями Международного эпизоотического бюро (МЭБ), вакцины против БТ, должны вызывать иммунитет у привитых животных продолжительностью не менее года (ОИЕ, 2000).

В связи с этим, задачей наших исследований являлось совершенствование технологии изготовления инактивированной бивалентной вакцины против ВБТ 4 и 16 серотипов и изучение её иммуногенной эффективности на крупном рогатом скоте (КРС) и мелком рогатом скоте (МРС).

**Связь темы диссертации с крупными научными программами.** Диссертационная работа выполнена в РГП НИИПББ КН МОН РК в рамках республиканских научных грантов № 0109РК00450; № 0112РК00306 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;
6. Изучение срока годности и стабильности вакцины при различных температурно-временных режимах;
7. 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 определен эпидемиологический статус блутанга в Казахстане.

Впервые в Казахстане разработана технология изготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против ВБТ 4 и 16 серотипов с

использованием нового коммерческого масляного адъюванта Montanide™ ISA-71VG, изучены ее иммунобиологические свойства в опытах на КРС и МРС, а также дана оценка ее протективной эффективности.

Определены вирусрепродуцирующие и технологические характеристики перевиваемых клеточных культур ВНК-21 и Е1-4, выращенных суспензионным методом. По результатам исследований выбрана культура ВНК-21, позволяющая получать вирус с более высокой биологической активностью.

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).

**Практическая значимость работы.** По результатам проведенных исследований усовершенствована технология изготовления вакцины против ВБТ 4 и 16 серотипов из вирулентных штаммов, позволяющая получить высокоиммуногенную, безопасную и эффективную бивалентную вакцину для КРС и МРС. Оформлена и утверждена НТД на профилактический биопрепарат.

**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.**

Оптимизация параметров суспензионного культивирования ВБТ 4 и 16 серотипов в культуре клеток ВНК-21.

Усовершенствование режима инактивации эпизоотических штаммов ВБТ 4 и 16 серотипов БПЛ.

Сравнительное изучение иммуностимулирующих свойств ГОА с сапонином и нового масляного адъюванта Montanide™ ISA-71VG в составе инактивированной бивалентной вакцины против БТ.

Изучение иммуногенной эффективности бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против ВБТ 4 и 16 серотипов на КРС и МРС.

**Личный вклад аспиранта.** 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 международных научно-практических конференциях, посвященных 50-летию образования НИИПББ (г. Алматы, 2008 г.), I-й международной конференции Астана БиoТех (г. Астана, 2008 г.), IV международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии", (г. Павлодар, 2008 г.), II-й международной конференции Астана БиoТех (г. Астана, 2011 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными, экзотическими 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, в том числе 2 статей в журналах входящих в РИНЦ, 1 статья в журнале, рецензируемом Thomson Reuters и 3 статьи в Перечне рецензируемых научных изданий, утвержденных президиумом ВАК Кыргызской Республики. По результатам выполненных работ получено 5 авторских свидетельств.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 196 страницах и содержит следующие разделы: введение, выбор направления исследований, результаты собственных исследований, обобщение и оценка результатов исследований, выводы, приложения. Список литературы включает 199 источника, в том числе 121 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 29 таблицами. В 10 приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность проведенных исследований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** представлена актуальность работы и необходимость усовершенствования технологии изготовления вакцины против ВБТ, согласно требованиям Международного эпизоотического бюро.

**В главе 1 «Обзор литературы»** представлены и анализированы отечественные и зарубежные литературные источники по распространению болезни, экономический ущерб, биологические свойства вируса, эпизоотическая ситуация, противоэпизоотические мероприятия, специфическая профилактика, а также классические технологии изготовления вакцины против данной болезни.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** приведены объект исследования, а также вирусологические, биотехнологические и иммунологические методы.

В работе были использованы вирулентные штаммы ВБТ 4 и 16 серотипов, выделенные от больных овец в Республике Таджикистан во время мониторинговых исследований в 2007 г.

*Объектами исследования являлись* вирулентные штаммы ВБТ 4 и 16 серотипов и технология приготовления вакцины.

*Предмет исследования*

1. Культуральные свойства ВБТ 4 и 16 серотипов.
2. Иммуностимулирующие эффективности адъювантов для приготовления вакцины.
3. Иммуногенная активность разработанной вакцины против блутанга на восприимчивых животных.

**Культивирование ВБТ** проводили согласно общепринятой методике в перевиваемой культуре клеток ВНК-21. Инфицирование клеток проводили в дозе 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл, при температуре инкубирования (37,0±0,5)°С.

**Инактивация вируса.** Вирус инаktivировали БПЛ в конечной концентрации 0.1% в течение 12 часов. Полноту инаktivации ВБТ определяли путем 3-х кратного пассирования в культуре клеток Vero, а также путем интрацеребрального заражения на 2-3 сут новорожденных мышат-сосунов.

**Составление вакцины.** Инаktivированные серотипы объединяли в равных антигенных нагрузках, затем вакцину готовили путем объединения масляного адъюванта Montanide ISA-71VG и инаktivированного 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.

**Безопасность и иммуногенность вакцины** оценивали на разных половозрастных МРС и КРС местной породы, доставленных из благополучных хозяйств по острым инфекционным заболеваниям.

**Безопасность вакцины** проверяли методом внутримышечного введения на овцах. Овцам вакцину вводили по 5 мл с внутренней стороны бедра.

**Иммуногенность вакцины** проверяли на клинически здоровых невакцинированных овцах, козах и телятах 6-12 месячного возраста, средней и выше средней упитанности. Овцам и козам вакцину вводили в/м по 1 мл с внутренней стороны бедра, а телятам по 2 мл в область третьего шейного позвонка. Животных контрольной группы оставляли непривитыми против ВБТ. Все группы животных наблюдали в течение 360 дней, и через каждый месяц на протяжении срока наблюдения отбирали сыворотки крови для изучения динамики формирования антител в РН и ИФА. После вакцинации проводили контрольное заражение двумя эпизоотическими штаммами 4 и 16 серотипов вируса в дозе по 5 мл смеси гомогената селезенки и вирулентной крови, при этом титр вируса был равен 10<sup>3</sup> – 10<sup>4</sup> ИД<sub>50</sub>/мл. Одновременно такой же дозой

заражали здоровых невакцинированных животных. Реакцию животных учитывали по 30-ти балльной шкале оценки признаков заболевания (Сергеев, 1974). Напряженность иммунитета оценивали 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.

**Все статистические анализы** проводились в GraphPadPrism® версии 6.0. Рассчитывали средние значения температуры тела животных, данные серологии, клинических признаков заболевания животных с выведением стандартной ошибки среднего. Значимость всех опубликованных величин была не ниже первого критерияльного порога ( $p < 0,05$ ).

**В главе 3 «Результаты собственных исследований»** представлены данные по серомониторинговым исследованиям животных Южного Казахстана на наличие антител к ВБТ. В результате проведенных исследований установлено, что антитела в сыворотках крови МРС к ВБТ содержались 11,8 %, также 14,21% сывороток крови КРС были положительными, что свидетельствует о наличии ВБТ в данных регионах.

**Получение вирусной биомассы для приготовления экспериментальных серий вакцины против БТ.** Первым этапом наших исследований являлось определение способности роста культур клеток ВНК-21 и EL-4 в суспензионных условиях. Проведенные исследования показали, что динамика накопления клеток при использовании ВНК-21 достигает пика на 3-е сут, а при использовании EL-4 – на 4 сут, далее отмечается остановка роста клеток и снижение числа жизнеспособных клеток. Таким образом, опытным путем установлено, что обе культуры пригодны для культивирования в суспензионных условиях. Однако, на следующем этапе необходимо было изучить чувствительность клеток к ВБТ и соответственно, выход активной биомассы.

При определении условий культивирования ВБТ в вихревом биореакторе изучали скорость перемешивания, концентрацию клеток и длительность культивирования вируса. Результаты этих опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Активность ВБТ выращенных в культурах клеток EL-4 и ВНК-21 при культивировании в биореакторе БИОК-022с

Пассажный уровень	Биологическая активность, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ( $X \pm m$ ), 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 пролефиративные 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 ( $p < 0.0001$ ).

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 ( $p < 0.0001$ ).

В следующей серии опытов изучали репродукцию вируса в зависимости от инфицирующей дозы и продолжительности культивирования. С этой целью культуру клеток ВНК-21 инфицировали ВБТ в дозах 0,1; 0,2 и 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. При минимальной дозе заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл процесс культивирования был продолжительнее на 1 - 2 сут (до 6 - 7 сут), чем при инокуляции 0,2 ТЦД<sub>50</sub>/кл (4 - 5 сут). Наибольшее накопление титра вируса отмечено при дозе заражения 0,2 ТЦД<sub>50</sub>/кл на 4 - 6 сут культивирования -  $6,00 \div 7,83 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Повышенные дозы заражения 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл не приводили к повышенному накоплению титра вируса в культуральных суспензиях. Также при заражении культуры клеток в дозе 0,2 ТЦД<sub>50</sub>/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 ТЦД<sub>50</sub>/кл). Согласно данным литературы для других вакцинных штаммов ВБТ оптимальной дозой заражения являлись от 0,1 до 0,2 ТЦД<sub>50</sub>/кл, что соответствует полученным нами результатам. В связи с этим для последующих опытов использовали дозу заражения 0,1 ÷ 0,2 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

В следующей серии опытов изучали возможность накопления вируса в культуре клеток ВНК-21 в суспензионных условиях без смены и со сменой поддерживающей питательной среды. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Влияние смены питательной среды на репродукцию ВБТ при суспензионном методе культивирования

Протокол	Время культивирования, ч	Доза вируса, ТЦД <sub>50</sub> /кл	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	Активность антигена, log <sub>2</sub>
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. 2 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  $5,6 \pm 0,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и  $3 \log_2$ , по сравнению с суспензией со сменой питательной среды, активность которого составила  $7,25 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и  $5 \log_2$  соответственно.

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, проводили при диапазонах от 6,9 до 8,0. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Влияние рН поддерживающей среды на репродукцию ВБТ в культуре клеток ВНК-21 в суспензионных условиях культивирования

рН среды	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Активность антигена в ИФА
6,9- 7,1	$5,67 \pm 0,08$	1:16
7,2-7,4	$7,33 \pm 0,08$	1:64
7,5-7,7	$6,42 \pm 0,08$	1:32

Из данных табл. 3 видно, что наиболее активно вирус репродуцируется в культуре клеток ВНК-21 при значениях от 7,2 до 7,7. В то же время изменение рН среды в кислую сторону приводит к снижению уровня накопления вируса.

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

Таким образом, в результате проведённых исследований определён клеточный субстрат (ВНК-21), а также установлены оптимальные параметры культивирования ВБТ (доза заражения от 0,1 до 0,2  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ , содержание сыворотки крови КРС - 5% в поддерживающей питательной среде, инкубирование при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 120 час), позволяющие получать вирусосодержащую суспензию с биологической активностью  $7,50 \div 7,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

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

**Инактивация вируса для приготовления вакцины против БТ.** Дальнейшей целью нашей работы было усовершенствование режима инактивации ВБТ БПЛ, изучение влияния концентрации инактиванта, рН

реакционной среды, температуры, продолжительности процесса инактивации, и влияние данных параметров на антигенные свойства вируса.

Инактивацию вируса проводили при температурах (2-8), 22 и 37<sup>0</sup>С с использованием 0,05%, 0,1% и 0,2% БПЛ. Результаты исследований оценивали по кривым инактивации и представлены на рис. 1 при температуре 37<sup>0</sup>С. Так как при температурах 2-8<sup>0</sup>С и 22<sup>0</sup>С во всех испытываемых концентрациях отмечалось сохранение инфекционной и утрата антигенной активности.

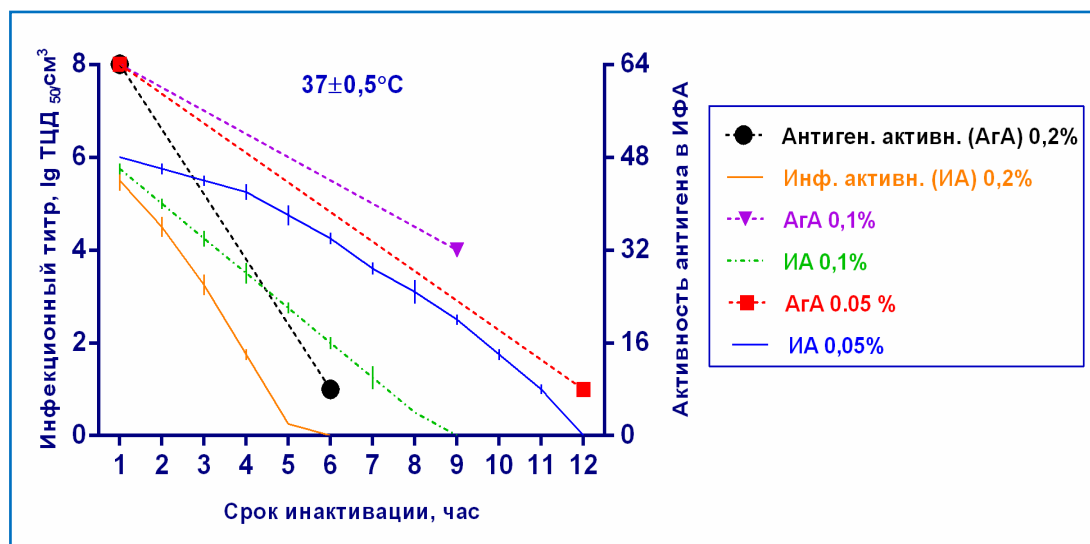


Рис. 1. Кинетика инактивации ВБТ при температуре (37±0,5) <sup>0</sup>С

Из данных рис. 1 видно, что при температуре (37±0,5) <sup>0</sup>С в концентрации инактиванта 0,05 % и 0,2 % вирус теряет как инфекционную, так и антигенную активность через 12 и 6 ч, соответственно. В концентрации инактиванта 0,1 % происходит полная инактивация инфекционной активности ВБТ в течение 9 ч, с максимальным сохранением антигенной активности.

В дальнейших экспериментах нами были проведены исследования по подбору рН реакционной среды, способствующей получению инактивированного ВБТ с более высокой антигенной активностью. В ходе проведенного исследования было установлено, что при испытываемых значениях рН реакционной среды (6,5-6,9; 7,0-7,4 и 7,5-8,0) наиболее продолжительный процесс инактивации наблюдается при значении рН (7,0-7,4). При этом антигенная активность вируса оставалась на исходном уровне в течение всего срока инактивации.

Анализируя приведённые выше результаты исследований, можно отметить, что БПЛ в концентрации 0,1% при температуре (37±0,5) <sup>0</sup>С в течение 12 ч. полностью разрушает инфекционные свойства ВБТ, сохраняя при этом его антигенную активность.

**Подбор эффективного адьюванта для приготовления вакцины.** Правильный выбор адьюванта является важной задачей в разработке

эффективных вакцин. С целью подбора адъювантов и изучения их эффективности нами были испытаны следующие адъюванты: гидроокись алюминия с сапонином (сорбированная вакцина) и новый коммерческий масляный адъювант Montanide™ ISA-71VG французской фирмы Seppic (эмульгированная вакцина). После приготовления двух типов вакцин измеряли значения их pH, вязкость и стабильность эмульсии. При изучении реактогенности учитывали реакцию привитых животных на введение вакцины, общее состояние животных, в том числе местную реакцию.

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.2) и хромота за счет введения вакцины с данным адъювантом (гидроокись алюминия).

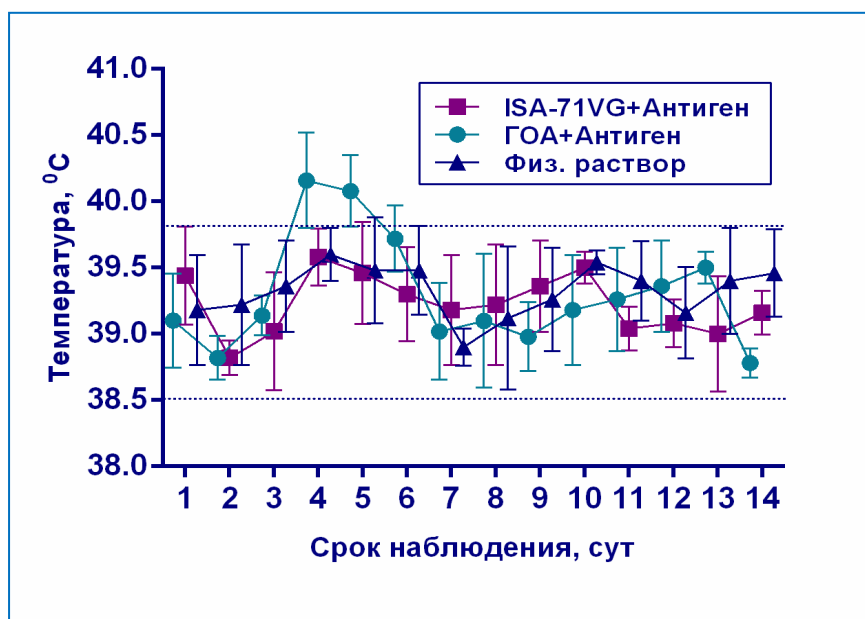
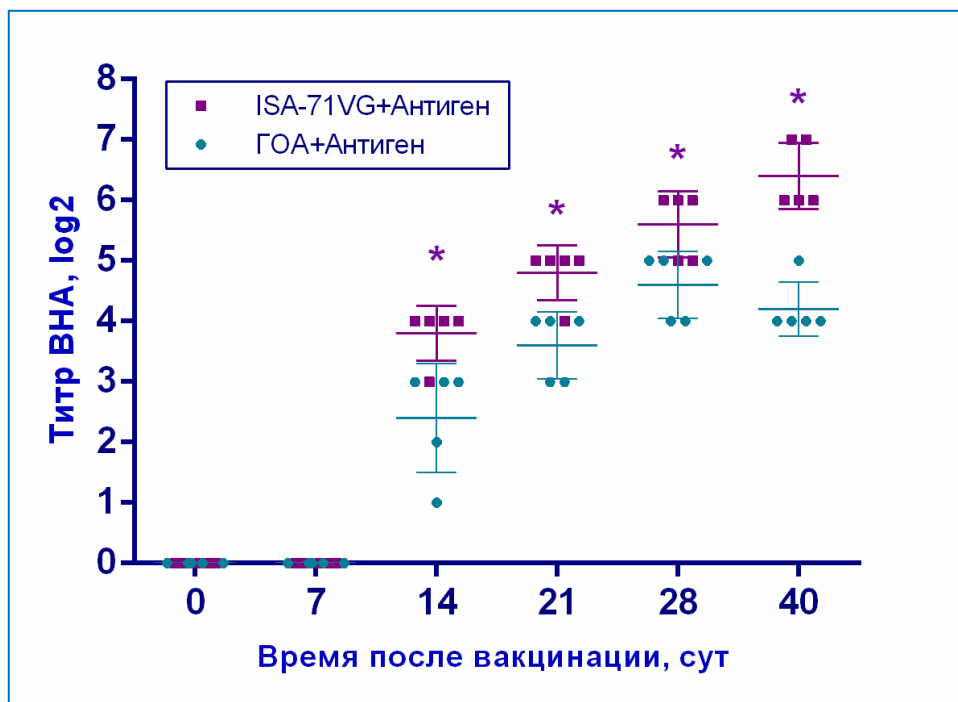


Рис. 2. Температурная реакция животных привитых сорбированной и эмульгированной вакцинами

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.2). Клиническое состояние у животных оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода наблюдения.

В следующих опытах изучали иммуногенность приготовленных сорбированной и эмульгированной вакцин на овцах (n=5). Результаты динамики накопления ВНА к ВБТ представлены в рис. 3.



Значения приведены как средние титры антител  $\pm$  SD. Статистический анализ проведен с помощью t-теста. \* -  $p < 0.05$ .

Рис. 3. Результаты исследования динамики формирования ВНА у вакцинированных животных.

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  $\log_2$ , 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.

По результатам проведенных исследований установлено, что 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.

**Определение минимальной прививной дозы вакцины.** Минимальную прививную дозу вакцины определяли на основе определения 50 %-ой иммунизирующей дозы вакцины (ИмД<sub>50</sub>). Результаты определения ИмД<sub>50</sub> инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов ВБТ приведены в табл. 4.

Таблица 4 – Определение ИмД<sub>50</sub> вакцины бивалентной инактивированной эмульгированной против ВБТ

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

Примечание «-» антитела в РН не обнаружены.

Из данных табл. 4 показано, что вакцина с разведения 1:2 до разведения 1:4 у всех вакцинированных овец (n=6) вызвала образование иммунного ответа с титрами от 1,5±0,18 до 1,8±0,21 log<sub>2</sub> 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±0,22 и 1,3±0,21 log<sub>2</sub> для 4 и 16 серотипов, соответственно. Антитела у животных, вакцинированных 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, и реакция на контрольное заражение составил в среднем 20 баллов.

Таким образом, ИмД<sub>50</sub> вакцины против ВБТ составила 0,041 мл. Протективность вакцины (ПД<sub>50</sub>) рассчитанная путем деления прививной дозы (1,0 мл) вакцины на значение ИмД<sub>50</sub> (0,041) составила 24,4 ПД<sub>50</sub>.

**Изучение влияния метода введения инактивированной вакцины против ВБТ на эффективность иммунизации.** Для этого животных прививали внутримышечно, подкожно и внутрикожно по 1,0 мл. Эффективность способов введения оценивали согласно бальной шкале на 30 сут после иммунизации. В результате опыта установлено, что 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±0,41 log<sub>2</sub>. 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 (табл. 5).

Таблица 5 – Влияние метода введения инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против 4 и 16 серотипов вируса блутанга на эффективность иммунизации

Метод введения	Титр ВНА, $\log_2$		Реакция на контрольное заражение			Эффективность вакцинации, %
	ВБТ-4	ВБТ-16	Количество овец в опыте / заболевшие	Оценка в баллах		
					максимальная	среднее по группе
ВМ	2,3±0,33	2,1±0,31	4/0	0	0	100
ВК	1,2±0,43	1,3±0,50	4/2	2	0,7	50
ПК	1,9±0,38	1,8±0,27	4/0	0	0,2	100
Контроль	0,0	0,0	4/4	30	23	0

Примечания: ВМ – внутримышечно; ВК – внутрикожно; ПК – подкожно;  
« - » - отсутствие клинические признаки; « + » - наличие клинические признаки

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.

**Определение влияния кратности введения и интервалов между введениями вакцины на ее иммуногенные свойства.** С целью проведения данных экспериментов (кратность и интервалы между введениями на эффективность иммунизации), эмульгированную вакцину вводили овцам внутримышечно по 1 мл однократно и двукратно (бустерная доза). При двукратной иммунизации ревакцинацию проводили через 7, 14, 21 и 28 день после первой. Контрольное заражение проводили на 60 сут после первого введения. Результаты исследований показаны в табл. 6.

Данные, приведенные в табл. 6, 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 день. Титр ВНА в сыворотках овец, привитых однократно и двукратно, перед контрольным заражением колебался от  $2,1 \pm 0,11$  до  $3,5 \pm 0,43 \log_2$  для обоих

серотипов ВБТ. Отсюда следует, что однократная иммунизация животным инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против ВБТ в объеме 1 мл считается приемлемым для овец при формировании 100% иммунитета.

Таблица 6 – Результаты иммуногенности инактивированной вакцины в зависимости от кратности ее введения

Кратность введения вакцины	Количество овец в опыте	Интервал вакцинации, сут	Титр ВНА, log <sub>2</sub>		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	6	7	2,3±0,32	2,4±0,21	0	100
	6	14	2,3±0,19	2,4±0,17	0	100
	6	21	3,1±0,22	3,2±0,50	0	100
	6	28	3,2±0,43	3,5±0,10	0	100
Контрольные животные	4				21	0

**Изучение срока наступления и длительности иммунитета, создаваемого у привитых овец.** 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. 7.

Таблица 7 – Результаты определения сроков наступления иммунитета у овец, вакцинированных инактивированной вакциной против ВБТ

Сроки заражения после иммунизации, сут	Количество овец в опыте	Титр ВНА, log <sub>2</sub>		Реакция на контрольное заражение		% протективности
		ВБТ-4	ВБТ-16	Количество реагирующих 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
Контроль	4			4	26	0

Примечание «n» – отсутствует ВНА в организме



Данные, представленные в табл. 7 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 животные приобретают иммунитет, при этом протективность вакцины составило 75%. В более ранние сроки после вакцинации у животных, привитых инактивированной эмульгированной бивалентной вакцины против ВБТ, иммунитет отсутствует.

**Продолжительность иммунитета животных привитых, инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной из 4 и 16 серотипов ВБТ.** Для определения продолжительности иммунитета животных, привитых инактивированной эмульгированной бивалентной вакциной против блутанга, 48 голов овец однократно прививали вакциной внутримышечно в дозе 1,0 мл. Результаты приведены на рис 4.

Из данных рис. 4 видно, что после введения вакцины на 7 сут в организме животных обнаруживались ВНА в титре 0,1-0,2  $\log_2$ . Увеличение титра антител отмечались на 14 сут от 0.83-0.9  $\log_2$  против 4-го и 16-го серотипов, которые достигли своего максимального титра (6.1-6.4  $\log_2$ ) на 60 сут после вакцинации. На 90 сут после вакцинации наблюдается уменьшение титров антител до 4.5-5.2  $\log_2$ , которые постепенно снижались до титра 1.8 -2.0  $\log_2$  на 360 сут после иммунизации. При этом уровень ВНА к обоим серотипам ВБТ в сыворотках крови иммунизированных овец не имели существенной разницы ( $P \geq 0,05$ ).

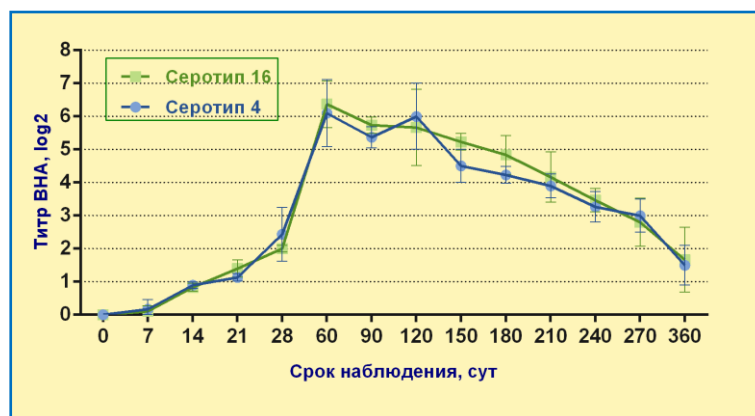


Рис. 4. Динамика образования ВНА в организме привитых овец, инактивированной вакциной против ВБТ

Кроме определения вируснейтрализующей способности сывороток крови вакцинированных овец, нами были проведены опыты по резистентности привитых животных к контрольному заражению вирулентным вирусом, которое 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 ( $10^3$  ИД<sub>50</sub>/мл). Реакцию на контрольное

заражение учитывали по бальной шкале (Абдураимов, 2016). В результате проведенных исследований установлено, что разработанная вакцина против БТ обеспечивает защиту привитых животных в опытах контрольного заражения в течение 360 сут после вакцинации. У контрольных, непривитых овец после заражения развивались признаки заболевания, характерные для БТ. При этом реакция на введения 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 вакцинированным и контрольным группами (27 баллов) подтверждает о высокой иммуногенности тестируемой вакцины.

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 иммуногенных свойств вакцины на козах и КРС.** Как известно основным резервуаром ВБТ являются КРС и козы. Эти виды животных более привлекательны для мокрецов в качестве прокормителя по сравнению с овцами. Поэтому данные виды животных, рассматривается как главное звено в распространении заболевания среди восприимчивых животных. В связи с этим при проведении противоэпизоотических мероприятий против БТ проводится массовая иммунизация именно КРС и коз.

На основании вышесказанного, в наших опытах изучали иммуногенность разработанной вакцины на КРС в дозе 2,0 мл. Установлено, 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  $\log_2$  для обоих серотипов. После чего отмечается снижение титров ВНА животных до 1,5 и 1,6  $\log_2$  на 360 сут после вакцинации соответственно для 4 и 16 серотипов ВБТ.

Продолжительность защитного эффекта вакцины определяли путем контрольного заражения вирулентным вирусом, которое проводили через 6 и 12 месяцев после иммунизации. Суммарные результаты этих опытов показаны в табл. 8.

Таблица 8 – Результаты определения продолжительности иммунитета вакцины против БТ на КРС

Сроки заражения после вакцинации в месяцах	Количество животных в опыте	Реакция на контрольное заражение		% протективность
		Количество реагиовавших животных	Оценка в баллах	
6	4	0	0	100
12	4	0	0	100
Контрольное заражение	4	4	16	0

Как видно из данных представленных в табл. 8, инактивированная эмульгированная бивалентная вакцина против БТ обеспечивают защиту привитых животных в опытах контрольного заражения в течение 12 месяцев 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 16,0 баллов.

Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что длительность иммунитета у КРС, вакцинированных в дозе 2,0 см<sup>3</sup> составила 12 мес.

В следующих сериях опытов изучили динамику накопления антител у привитых коз. В результате установлено, что антитела в сыворотках привитых начинают выявляться через 7 сут после вакцинации, достигая максимального титра (6.0 – 6.3 log<sub>2</sub>) через 1,5-2,0 мес., и сохраняются на этих титрах до 4-х мес., после чего отмечаются снижение титра антител в сыворотках. Эффективность вакцинации через 3, 6 и 9 мес. после контрольного заражения показало 100% защиту от вирулентных штаммов ВБТ.

Исходя из вышеуказанных данных, продолжительность иммунитета у коз, привитых в дозе 1,0 см<sup>3</sup> составила 12 мес.

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 препарата при длительном хранении.

**Для определения срока годности вакцины** в нативном состоянии ее хранили при температурах (20±2) °С, (37±1) °С в течение 5, 10, 20 сут и (2-8) °С в течение 6 и 12 мес. В результате установлено, что вакцина при температурах хранения (20±2) °С, (37±1) °С в течение от 5 до 20 сут 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.

Суммируя результаты проведенных исследований, следует отметить, что иммуногенность данной вакцины против БТ сохраняется при (2-8) °С в течение 12 мес., и тем самым отвечает требованиям МЭБ, предъявляемым при транспортировке и хранении вакцинных препаратов.

Для проверки безопасности и иммуногенности инактивированной вакцины против БТ (катаральной лихорадки овец) было организовано и проведено внутри-институтское 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.).

Технология изготовления вакцины инактивированной эмульгированной бивалентной против БТ соответствует представленной НТД.

## **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 ТЦД<sub>50</sub>/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 lgТЦД<sub>50</sub>/мл) и антигенной (1:16) активностью.

3. Совершенствован режим инактивации вируса бета-пропиолактоном, который в конечной концентрации 0,1% инактивирует 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 инактивированной вакцины, в результате которой был подобран масляный адъювант Montanide™ ISA-71VG обладающей более иммуногенной активностью, умеренной ректогенностью и низкой вязкостью в составе инактивированной 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 РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для внедрения разработанной вакцины в производство разработан и утвержден в установленном порядке комплект НТД на вакцину, включающий:

- Стандарт организации на вакцину (СТ 405-1919-04 ГП-070-2011).

- Временную инструкцию по изготовлению и контролю вакцины инактивированной бивалентную эмульгированной против БТ (катаральная лихорадка овец).

- Временное наставление по применению вакцины инактивированной бивалентной эмульгированной против БТ (катаральная лихорадка овец).

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

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

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

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

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

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

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

7. **Жугунисов, К.Д.** Сравнительное изучение методов культивирования штамма «Хуросон-07/4» вируса катаральной лихорадки овец [Текст] / Ж.Т. Аманова, Е.О. З.Д. Ершебулов, Д.С. Таранов, К.Д. Жугунисов, Е.А. Булатов Е.О. Абдураимов // Известия ВУЗов Кыргызстана 2014. №5. – С.118-119.

8. **Жугунисов, К.Д.** Получение вируса блутанга в культурах клеток внк-21/17 и е1-4 суспензионным методом [Текст] / Жугунисов, К.Д. Жунушов А.Т., Ершебулов З.Д., Таранов Д.С., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А., Абдураимов Е.О.// Известия НАН КР, 2017, №1, с.17-21

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

10. **Жугунисов, К.Д.** Сравнительная оценка эффективности различных адьювантов при изготовлении инактивированной вакцины против блутанга [Текст] / Жугунисов, К.Д. Жунушов А.Т., Ершебулов З.Д., Таранов Д.С., Абдураимов Е.О.// Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2017. Т. 35. № 3. С. 31-37.

11. **Zhugunissov, K.** Beta-propiolactone inactivated bivalent bluetongue virus vaccine containing Montanide ISA-71VG adjuvant induces long-term immune response in sheep against serotypes 4 and 16 even after 3 years of controlled vaccine storage [Текст] / K. Zhugunissov, Ye. Bulatov, D. Taranov, Z. Yershebulo, Zh. Koshemetov, A. Zhunushov, G.J. Renukaradhya, K. Tabynov, Ye. Abduraimov // Veterinary Microbiology 226 (2018) 23–30 (Thompson Reuters - IF-2.524).

**Жугунисов Куандык Даулетбаевичтин «Блутанг ылаңынын профилактикалык каражаттары жана ага каршы вакцина даярдоо технологиясын жакшыртуу» деген темада 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты даражасын алуу үчүн жазылган диссертациясынын кыскача**

### **КОРУТУНДУСУ**

**Негизги сөздөр:** блутанг, технология, профилактика, штамм, инактивацияланган вакцина, иммуногендүүлүк.

**Изилдөөнүн объектиси:** блутанг ылаңынын вирусу, инактивацияланган вакцина, бодо жана майда мал

**Изилдөөнүн предмети:** блутанг ылаңынын вирусу культуралдык касиеттери, адьюванттардун иммуностимулдук эффекдүүлүгү жана вакцинанын иммуногендик активдүүлүгү.

**Иштин максаты.** Блутанг ылаңына каршы инактивацияланган вакцинаны даярдоо технологиясын жакшыртуу жана анын иммунобиологиялык касиетин бодо мал менен майда малды изилдөө.

**Изилдөөнүн ыкмалары:** биотехнологиялык, вирусологиялык, серологиялык, иммунологиялык.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы.** Казахстандын түштүк областарындагы жаныбарларды инфекцияны эрте аныктоо үчүн серомониторинг жүргүзүлдү.

ВНК-21/17 жана Е1-4 клетка культураларынын суспензиялык адисинин технологиялык жана вирустун репродукциялык сапаттамалары аныкталды.

Блутанг ылаңынын вирусун бета-пропиолактон менен инактивациялоонун оптималдуу жаны режими аныкталып, антигендик активдүүлүгү максималдуу сакталган инактивацияланган вирус алынды.

Казахстанда биринчи жолу блутанг ылаңынын вирусунун 4-чү жана 16-чы серотиптерине каршы инактивацияланган эмульгирленген вакцинасын Montanide™ ISA-71VG жаңы коммерциялык майлуу адьювантты колдонуу менен иштелип чыкты. Вакцинанын иммунобиологиялык касиеттери бодо жана майда малдарда изилденди жана анын протективтик эффективдүүлүгүнө баа берилди.

Блутанг ылаңынын вирусунун 4-чү жана 16-чы серотиптерине каршы инактивацияланган эмульгирленген вакцинасы Montanide™ ISA-71VG жаны коммерциялык майлуу адьювантты менен бирге 1,0 мл (майда малга) же 2,0 мл (бодо малга) дозадан бир жолу иммунизацияланганда жаныбарларда 10-чү күндөн баштап 12 айга чейинки иммунитет пайда болот.

**Колдонулуучу чөйрө:** биотехнология, вирусология, ветеринардык практика.

## РЕЗЮМЕ

**диссертации Жугунисова Куандык Даулетбаевича на тему: «Совершенствование средств профилактики и технологии изготовления вакцины против блутанга» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология**

**Ключевые слова:** блутанг, технология, профилактика, инактивированная вакцина, иммуногенность.

**Объект исследования:** вирус блутанга, мелкий и крупный рогатый скот, инактивированная вакцина.

**Предмет исследования:** Культуральные свойства вируса блутанга, иммуностимулирующие эффективности адьювантов и иммуногенная активность вакцины.

**Цель работы:** Совершенствование технологии приготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против блутанга КРС и МРС и изучение ее иммунобиологических свойств..

**Методы исследования:** биотехнологический, вирусологический, серологический, иммунологический

**Полученные результаты и их новизна:** Впервые в южном регионе Казахстана проведен серомониторинг с полным охватом сельскохозяйственных животных для раннего выявления инфекции и быстрого реагирования.

Определены вирусрепродуцирующие и технологические характеристики перевиваемых клеточных культур ВНК-21/17 и Е1-4 суспензионным методом.

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

Впервые в Казахстане разработана технология изготовления бивалентной инактивированной эмульгированной вакцины против блутанга 4-го и 16-го серотипов с использованием новым коммерческим масляным адъювантом Montanide™ ISA-71VG, изучены ее иммунобиологические свойства в опытах на КРС и МРС, а также дана оценка ее протективной эффективности.

Инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина с новым коммерческим масляным адъювантом Montanide™ ISA-71VG в дозе 1,0 мл (для МРС) или 2,0 мл (для КРС) при однократном внутримышечном иммунизации создает иммунитет у животных на 10 сут после вакцинации, который длится не менее 12 мес (срока наблюдения).

**Область применения:** биотехнология, вирусология, ветеринарная практика.

## SUMMARY

**Dissertation of the Zhugunissov Kuandyk on the title: "Improving the prevention means and technology for manufacturing the bluetongue vaccine" for the degree of candidate of biological sciences in specialty 03.01.06 - Biotechnology**

**Key words:** bluetongue, technology, prevention, inactivated vaccine, immunity

**Object of the study:** bluetongue virus, small ruminants and cattle, inactivated vaccine.

**Object of the research:** The cultural properties of the bluetongue virus, immunostimulating efficacy of adjuvants and immunogenic activity of the vaccine.

**Objective:** Improving the technology of preparation of inactivated emulsified bivalent bluetongue vaccine for cattle and small ruminants and studying its immunobiological properties.

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

**The obtained results and their novelty:** For the first time in the southern region of Kazakhstan seromonitoring was carried out with full coverage of farm animals for early detection of infection and rapid response.

The virus-producing and technological characteristics of transplantable ВНК-21/17 and EI-4 cell cultures were determined by the suspension method.

As a result of the experiments, optimal parameters for inactivation of the bluetongue virus with the use of BPL, maximally preserving its antigenic activity, were selected.



For the first time in Kazakhstan, a technology was developed for manufacturing a inactivated emulsified bivalent bluetongue vaccine using the new commercial oil adjuvant Montanide™ ISA-71VG, its immunobiological properties and protective effectiveness were studied on cattle and small ruminants experiments.

The inactivated emulsified bivalent vaccine with the new commercial oil adjuvant Montanide™ ISA-71VG at a dose of 1.0 ml (for small ruminants) or 2.0 ml (for cattle) with a single intramuscular immunization creates immunity in animals 10 days after vaccination, which does not last less than 12 months (observation period).

**Applications:** biotechnology, virology, veterinary practice.

---

**Отпечатано в ОсОО «Соф Басмасы»**  
720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева 92.  
Тираж 100 экз.

