

[DOI:10.26104/NNTIK.2023.20.65.007](https://doi.org/10.26104/NNTIK.2023.20.65.007)

Тайлакова Э.Т., Султанкулова К.Т., Жунушов А.Т., Червякова О.В.

**КОЙ ЧЕЧЕККЕ КАРШЫ РЕКОМБИНАНТТЫК ВАКЦИНАНЫН
ОПТИМАЛДУУ ЭМДӨӨ ДОЗАСЫН АНЫКТОО**

Тайлакова Э.Т., Султанкулова К.Т., Жунушов А.Т., Червякова О.В.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ИММУНИЗИРУЮЩЕЙ ДОЗЫ
РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ**

E. Tailakova, K. Sultankulova, A. Zhunushov, O. Chervyakova

**DETERMINATION OF THE OPTIMAL IMMUNIZING DOSE
OF RECOMBINANT SHEEP POX VACCINE**

УДК: 619:615.375:578.821.21:577.112.6

Макалада рекомбинанттык кой чечекке каршы вакцина-нын иммунизациялоочу дозасын аныктоо жана тандоо боюнча изилдөөлөрдүн жыйынтыктары келтирилген. Изилдөөлөрдүн жүрүшүндө максаттуу жаныбарлар рекомбинанттык вакцина менен койлордун чечегине каршы ар кандай антигендик жүктөмү 75 мкг, 150 мкг жана 300 мкг менен иммунизацияланган. Натыйжада, жаныбарлардын кан сывороткалары ферменттик иммунологиялык анализ жана спецификалык анти-телолордун болушуна нейтралдаштыруу реакциясы менен тандалып алынган жана изилденген. Ошондой эле койлордун чечек вирусунун эпизоотиялык «А» штаммынын жардамы менен контролдук инфекция жүргүзүлдү. Алынган маалыматтарды талдап көрсөк, малды инфекциядан коргоо үчүн оптималдуу иммунизациялоочу доза ар бир SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122 рекомбинанттык белоктун 75 мкг антигендик жүгү бар вакцина экени аныкталган.

Негизги сөздөр: кой чечеги, алдын алуу, рекомбинанттык вакцина, иммунизациялоочу доза, ферментти иммунизациялоо анализи, нейтралдаштыруу реакциясы, нейтралдаштыруу индекси.

В статье представлены результаты исследований по определению и подбору иммунизирующей дозы рекомбинантной вакцины против оспы овец. В ходе исследований были иммунизированы целевые животные рекомбинантной вакциной против оспы овец с различной антигенной нагрузкой по 75 мкг, 150 мкг и 300 мкг на мл. В результате были отобраны и исследованы сыворотки крови животных методами ИФА и РН на наличие специфических антител. Также было проведено контрольное заражение с использованием эпизоотического штамма «А» вируса оспы овец. Анализируя полученные данные, было установлено, что для защиты животного от заражения оптимальной иммунизирующей дозой является вакцина с антигенной нагрузкой по 75 мкг каждого рекомбинантного белка SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122 вируса оспы овец в одном мл.

Ключевые слова: оспа овец, профилактика, рекомбинантная вакцина, иммунизирующая доза, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации, индекс нейтрализации.

The article presents the results of studies to determine and select the optimal immunizing dose of the recombinant sheep pox vaccine. During the studies, animals were immunized with a recombinant sheep pox vaccine with different concentration of antigens of 75 µg, 150 µg and 300 µg per ml. As a result, animal blood sera were selected and was evaluated using ELISA and NT for the presence of specific antibodies. A challenge was also carried out using the epi-

zootic strain “A” of the sheep pox virus. Analyzing the data obtained, it was found that to protect an animal from infection, the optimal immunizing dose is a vaccine with concentration of antigens of 75 µg of each recombinant protein SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122 sheep pox virus in one ml.

Key words: sheep pox, prevention, recombinant vaccine, immunizing dose, enzyme immunoassay, neutralization reaction, neutralization index.

Введение. В настоящее время, несмотря на проведение профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию оспы овец, ситуация по этому заболеванию остается напряженной. Периодические, местами постоянные, вспышки оспы овец наносят огромный ущерб, как в экономической, так и в социальной отрасли республики, где основу животноводства составляет овцеводство. Специалисты многих стран бьют тревогу о том, что данное заболевание представляет серьезную опасность для разведения мелких жвачных животных, для продовольственной безопасности и ограничивает международную торговлю животными и сырьем животного происхождения [1]. В эндемичных районах из-за болезни идут значительные потери в продуктивности, снижении прироста веса, повреждения шкуры и кожи, заболевание приводит к абортam у суягных животных, есть риск возникновения вторичной инфекции, и в конечном итоге смертность, которая у молодых животных достигает до 100% [2]. Также экономический ущерб заключается в проведении вынужденного убоя поголовья животных во время вспышек данного заболевания и затратами на проведение карантинно-охранных и ветеринарно-санитарных мероприятий [3].

Оспа овец, возбудителем которой является *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae* распространено по всей юго-восточной и центральной Азии, на Индийском полуострове, а также в Северной и Центральной Африке. Напряженной остается и ситуация в странах СНГ Среднеазиатского и Кавказского регионов (Казахстане, Киргизии, Таджикистане, Азербайджане

и Грузии). Поскольку оспа овец является трансграничным особо опасным вирусным заболеванием, инфекция подлежит обязательному официальному уведомлению в МЭБ [4].

Единственным верным инструментом в борьбе с инфекцией, против которого нет специфического лечения является вакцинопрофилактика. Для профилактики оспы овец используются как аттенуированные, так и инактивированные варианты вакцин [5]. Несмотря на это, вспышки оспы овец регистрируют как в ранее неблагополучных, так и в новых регионах республики [6]. В таких ситуациях является целесообразным использование современных вакцин, полученных с использованием новых рекомбинантных технологий. Иммуногенные свойства вакцины зависят от основных антигенов входящих в ее состав. Антигенная нагрузка в вакцинном препарате имеет важную роль, поскольку именно активность антигена запускает процессы иммунного ответа на возбудитель.

Исходя из вышеизложенного целью данных исследований является определение оптимальной иммунизирующей дозы рекомбинантной гидроокисью-алюминиевой вакцины на основе бактериально-экспрессированных рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117 и SPPV122 вируса оспы овец, разработанной в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности МЗ РК.

Материалы и методы исследования. Исследования по определению иммунизирующей дозы проводились на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности МЗ РК с соблюдением всех правил биозащиты, биобезопасности и правил по обращению с лабораторными животными [7, 8].

Исследования проводили на овцах в возрасте от 6 мес до 2 лет. Было сформировано 5 групп (3 опытные и 2 контрольные группы) по 2 овце в каждой. Для иммунизации овец были испытаны три дозы вакцины, отличающейся содержанием белков: по 300 мкг 150 мкг и по 75 мкг каждого белка в одной прививной дозе вакцины. Иммунизацию проводили внутримышечно по 1 мл двукратно с интервалом 28 сут. В качестве контроля использовали живую аттенуированную вакцину НИСХИ и фосфатно-солевой буферный раствор.

Наблюдение за общим клиническим состоянием животных опытных и контрольных групп вели в течение 3 недель после последней иммунизации. У всех животных отбирали образцы крови на 1, 28 и 42 день эксперимента для проведения анализа сывороток в ИФА и в реакции нейтрализации вируса в культуре клеток ТЯ на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА). Протективный иммунитет определяли методом контрольного заражения согласно OIE Terrestrial Manual [9].

Иммуноферментный анализ. 96 луночные план-

шеты сенсibilizировали смесью очищенных рекомбинантных белков вируса оспы овец SPPV060, SPPV117, SPPV122 и SPPV095 в концентрации по 1 мкг/мл каждого в течение ночи при 4°C. Отмывали планшеты 3 раза по 200 мкл промывочным буфером (150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,05% твин-20). Для блокирования вносили по 200 мкл блокирующего буфера (5% обезжиренное сухое молоко, 150 mM NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,05% твин-20), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Исследуемые сыворотки разводили от 1:1000 до 1024000 блокирующим буфером и вносили по 100 мкл в лунку. Далее планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 ч, отмывали 3 раза по 200 мкл промывочным буфером, после чего вносили вторичные антитела меченные щелочной фосфатазой в разведении 1:20000, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Отмывали 3 раза по 200 мкл промывочным буфером и вносили по 100 мкл субстрата pNPP. Далее планшеты инкубировали в темноте в течение 30 мин. Учет результатов проводили через 30 мин после добавления субстрата на иммуноферментном анализаторе при длине волны 405/630 нм.

Реакция нейтрализации вируса. Все работы проводились в ШББ 2 класса. Реакцию нейтрализации вируса проводили в первичной культуре клеток тестикулы ягненка. Монослой культуры обрабатывали трипсином и ресуспендировали в полной среде. Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра, вносили в лунки 96-луночных планшетов в концентрации 5×10^4 кл/лунка и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение суток до достижения 80-90% конfluентности. Перед использованием тестируемые сыворотки инактивировали нагреванием при 56 °C в течение 30 мин и разводили 1:10 фосфатно-солевым раствором, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Готовили десятикратные разведения вируса оспы овец rSPPV (TK-)EGFP с активностью не ниже 5,5 lgТЦД₅₀/мл от 10⁻¹ до 10⁻⁷, используя среду ПСП без добавления фетальной бычьей сыворотки. Затем к каждому разведению вируса (1 мл) добавляли равный объем исследуемой сыворотки. Смесью сыворотки с разведениями вируса инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Каждым разведением вируса (0,2 мл) инфицировали по 10 лунок 96-луночного планшета с выраженным монослоем. В один планшет в ряды А-Г вносили смесь одной исследуемой сыворотки с разным разведением вируса (10⁻¹ - 10⁻⁷, соответственно) во все столбцы с 1 по 10, в полный ряд Н вносили по 200 мкл исследуемой сыворотки со средней ПСП (контроль сыворотки). В 11 и 12 столбцы вносили по 200 мкл среды ПСП (контроль среды). Параллельно разведения вируса соединяли с фосфатно-солевым раствором (контроль вируса). Далее инкубировали вирус с клетками

2 часа, после чего смесь вируса с исследуемой сывороткой удаляли и вносили среду ПСП с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки. Культуру клеток инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение одной недели, вели учет цитопатического эффекта. Результаты учитывали на 7 день по наличию цитопатических изменений в культуре клеток и по флуоресценции.

Индекс нейтрализации представляет собой разницу в титрах вируса в сыворотках одной овцы до и после вакцинации. Индекс $\geq 1,5$ Ig является положительным [10].

Результаты исследований и их обсуждение.

Для определения иммунизирующей дозы были приготовлены серии препаратов с антигенной нагрузкой по 300 мкг, 150 мкг и 75 мкг каждого белка SPPV060, SPPV095, SPPV117 и SPPV122 в 1 мл (одной прививочной дозе), адсорбированные на гидроокись алю-

миния. Схема постановки опыта и результаты приведены в таблице 1.

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). В результате было установлено, что до иммунизации в образцах крови овец всех групп не были обнаружены нейтрализующие вирус антитела. В динамике температуры тела овец на период наблюдения не было выявлено существенных отклонений. Все овцы во время карантина оставались клинически здоровыми. Через две недели после последнего введения вакцины овец опытной и контрольной групп подвергали контрольному заражению эпизоотическим штаммом «А» вируса оспы овец. Результаты контрольного заражения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Определение иммунизирующей дозы

Номер группы	ID животных	Препарат для иммунизации	Титр антител в ИФА, DPI 42	Индекс нейтрализации сыворотки, DPI 42	Титр вируса при контрольном заражении, Ig ИД ₅₀
I	3713	РВОО/75 мкг	1:16000	0,6	2,75
	3539		1:16000	0,6	2,50
II	3529	РВОО/150 мкг	1:64000	н/и	4,00
	6036		1:51200	н/и	3,00
III	3686	РВОО/300 мкг	1:32000	н/и	3,00
	1160		1:6400	н/и	4,00
IV	3484	НИСХИ	< 1:500	0,7	0,00
	3358		< 1:500	0,6	0,00
V	3445	PBS	< 1:500	0,0	4,25
	3406		< 1:500	0,0	4,00

Примечание:
 ID – идентификационный номер животных
 DPI – день после иммунизации
 РВОО – рекомбинантная вакцина против оспы овец
 н/и – не идентифицировано

Полученные в результате данные, представленные в таблице 1 свидетельствуют об отсутствии корреляции между титром антител в ИФА, индексом нейтрализации сыворотки и протективным иммунитетом. Несмотря на высокие титры антител, индуцированные введением РВОО/150 мкг и РВОО/300 мкг, разница в титрах вируса при контрольном заражении в среднем составила 0,6 Ig, тогда как при использовании РВОО/75 мкг – 1,5 Ig. Согласно наставлениям МЭБ вакцина обеспечивает 100% защиту от заражения при разнице в титрах вируса у иммунных и контрольных животных 2,5 Ig. Поскольку наиболее близкое значение было получено при использовании на-

грузки антигенов по 75 мкг, данная доза считается оптимальной для защиты от заражения вирусом.

Заключение. Согласно полученным результатам оптимальной иммунизирующей дозой рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакцины против оспы овец является использование по 75 мкг каждого антигена SPPV060, SPPV095, SPPV117 и SPPV122 в 1мл.

Примечание. Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 1292/ГФ4 «Рекомбинантная вакцина для профилактики оспы овец» на 2015-2017 гг. (№ ГР0115РК01983).

Литература:

1. Tuppurainen E., Venter E.H. and Shisler J.L. Review: Capripox-virus diseases: Current status and opportunities for control. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015. №.64 (3). P. 729-745.
2. Haller S.L., Peng C., McFadden G. and S. Rothenburg. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014. №. 21. P. 15-40.
3. Самуйленко А.Я., Соловьева Б.В., Воронина Е.А. Инфекционная патология животных. – М.: Академкнига. 2006. - Т.1. - С. 759-805.
4. Haller S.L., Peng C., McFadden G., Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014. №. 21. P. 15-40.
5. Сейткасымов Б.К. Усовершенствование технологии изготовления и способ применения вирусвакцины против оспы овец из штамма НИСХИ. Дисс. канд. вет. наук. Гвардейский: НИСХИ. 1990. - С. 171.
6. Эпизоотическая ситуация по оспе овец // [Электронный ресурс]: <https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/zarubezhnye-strany/ospa-ovec-i-koz/>.
7. Калашников А.П., Фисинина В.И., Щеглова В.В., Клейменова Н.И. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: справ. – М.: Россельхозакадемия, 2003. - С. 456.
8. Правила обеспечения биологической защиты. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 2 ноября 2022 года № КР ДСМ - 125.
9. Sheep pox and Goat pox. OIE Terrestrial Manual 2017 // [электронный ресурс]: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_S_POX_G_POX.pdf.
10. Sheep Pox and Goat Pox // [электронный ресурс]: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_S_POX_G_POX.pdf.
11. Таранов Д.С., Аманова Ж.Т., Булатов Е.А., Баракбаев К.Б., Ибраимова Н.М., Абдрахманова Б.С. Определение минимальной полевой иммунизирующей дозы ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец. / *Известия ВУЗов Кыргызстана*. 2014. №.5. С. 150-152.