Изучение формирования раннего иммунитета у естественно восприимчивых животных против ящура типа О

Д. В. Михалишин¹, Д. А. Лозовой², В. А. Стариков³, Ю. С. Елькина⁴, М. И. Доронин⁵, А. В. Борисов⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Риск возникновения вспышек ящура на территории Российской Федерации диктует необходимость усиления противоящурных мероприятий, направленных на предупреждение заноса вируса в страну и включающих проведение систематических мониторинговых исследований, а также осуществление поголовной вакцинации восприимчивых животных в буферной зоне. Исследования по разработке вакцин для ранней защиты подтверждают, что при их использовании происходит выработка вируснейтрализующих антител у естественно восприимчивых животных в зоне вспышки, что служит защитой от заражения ящуром, приводит к сдерживанию инфекции и ее купированию в первичном очаге. Учитывая высокую скорость распространения инфекции, такая мера контроля, как применение вакцин против ящура, обеспечивающих раннюю защиту, должна применяться сразу после вспышки. Представлены результаты исследований по формированию гуморального иммунитета у естественно восприимчивых животных на введение инактивированных эмульсионных противоящурных вакцин, способных обеспечить раннюю защиту против ящура типа О. Для изготовления вакцин использовали культуральный вирус ящура штаммов О/Приморский/2012, О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017. Иммуногенную активность вакцин проверяли на крупном рогатом скоте, свиньях и овцах. Выявлено, что моновалентная эмульсионная противоящурная вакцина из штамма О/Монголия/2017 через 7 сут после однократного введения в дозе 2 см³ индуцировала выработку вируснейтрализующих антител в количестве, достаточном для защиты от заражения гомологичным штаммом. Вакцины из штаммов вируса ящура О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 при введении двойной дозы способны защитить животных на ранних сроках от заражения гетерологичным штаммом вируса ящура О/Монголия/2017. Вакцинные препараты из указанных штаммов вызывают формирование иммунитета в ранние сроки (на 7-е сут после вакцинации) против ящура типа О. Данные препараты предлагается использовать в зонах повышенного риска заноса вируса.

Ключевые слова: ящур типа О, инактивированная моновалентная эмульсионная вакцина, ранняя защита, реакция нейтрализации.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств по государственному контракту № 25/19 по теме «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию новых защитных препаратов на основе циркулирующих вновь выделенных изолятов особо опасных и экзотических инфекций животных и их испытание».

Для цитирования: Михалишин Д. В., Лозовой Д. А., Стариков В. А., Елькина Ю. С., Доронин М. И., Борисов А. В. Изучение формирования раннего иммунитета у естественно восприимчивых животных против ящура типа О. *Ветеринария сегодня*. 2020; 2 (33): 94–101. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-94-101.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

Studies on development of early immunity against type O FMD in naturally susceptible animals

D. V. Mihalishin¹, D. A. Lozovoy², V. A. Starikov³, Yu. S. El'kina⁴, M. I. Doronin⁵, A. V. Borisov⁶

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-2986-8992, e-mail: elkina_ys@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

SUMMARY

FMD risk in the Russian Federation dictates the need for enhanced measures aiming to prevent the introduction of FMD virus and comprising systematic monitoring research and mass vaccination of susceptible animals in the buffer zone. Research into the development of vaccines for early protection confirm that their use induces the formation of virus-neutralizing antibodies in naturally susceptible animals in the outbreak area, which protects from FMD infection, limits its spread and contains it within the primary outbreak. Taking into account the high speed of the infection spread, such a control measure as using FMD vaccines which induce early protection should be adopted immediately after the occurrence of the outbreak. The article presents the results of the research into the formation of humoral immunity in naturally susceptible animals triggered by administration of inactivated emulsion FMD vaccines capable of ensuring early protection against type O FMD. Culture FMD virus of O/Primorsky/2012, O/Saudi Arabia/08 and O/Mongolia/2017 strains was used for vaccine production. Immunogenic activity of vaccines was tested in cattle, pigs, and sheep. It was found that monovalent emulsion FMD vaccine based on O/Mongolia/2017 strain induced the formation of virus-neutralizing antibodies in the quantity necessary to protect against the homologous strain in seven days after a single administration in the dose of 2 cm³. Vaccines based on O/Saudi Arabia/08 and O/Primorsky/2012 FMDV strains can protect animals from infection with heterologous O/Mongolia/2017 strain at early stages if a double dose is administered. Vaccines based on the above-mentioned strains induce early immunity formation (seven days after vaccination) against type O FMD. We suggest using the given products in the zones of a higher risk of the virus introduction.

Key words: type O FMD, inactivated monovalent emulsion vaccine, early protection, virus neutralization test.

Acknowledgements: The work was financed under the Governmental Contract 25/19: Research and experimental activities for the development of protective products based on newly isolated currently circulating agents of highly dangerous and exotic animal infections and their testing.

For citation: Mikhailishin D. V., Lozovoy D. A., Starikov V. A., El'kina Yu. S., Doronin M. I., Borisov A. V. Studies on development of early immunity against type O FMD in naturally susceptible animals. *Veterinary Science Today*. 2020; 2 (33): 94–101. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-94-101.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур является экономически значимым вирусным заболеванием диких и домашних парнокопытных животных из-за наличия большого количества естественно восприимчивых видов, существенного влияния на продуктивность животных и быстрого распространения внутри и между соседними географическими регионами. Вспышки ящура приводят к большим экономическим потерям в результате огромных затрат на проведение санитарных мероприятий, направленных на искоренение заболевания [1–3].

В настоящее время в хозяйствах многих стран, даже с проинформированными об опасности заболевания владельцами скота и обученным персоналом ветеринарных служб, вспышки ящура могут по-прежнему оставаться незамеченными до тех пор, пока болезнь не распространится за пределы первичного очага. Данная ситуация складывается из-за отсутствия идентификации клинических признаков ящура, при задержке или отсутствии информации о заболевших животных, а также из-за незаконного перемещения скота или зараженных продуктов животного происхождения [4, 5].

В период с сентября 2017 г. по март 2018 г. в нескольких аймаках Монголии, граничащей на севере с Россией, а на юге с Китаем, было зарегистрировано около 30 вспышек ящура типа О у крупного рогатого скота, овец и коз. Риск возникновения вспышек заболевания на территории РФ диктует необходимость усиления противоящурных мероприятий, направленных на предупреждение заноса вируса в страну и включающих проведение систематических мониторинговых исследований, а также осуществление поголовной вакцинации восприимчивых животных в буферной зоне [4, 6, 7]. Учитывая высокую скорость распространения инфекции, сразу после вспышки необходимо

применять вакцины против ящура, обеспечивающие раннюю защиту животных.

За многие десятилетия доказана высокая эффективность и неоспоримая польза вакцин в борьбе с инфекционными заболеваниями. Для специфической профилактики ящура широко применяют моно- и поливалентные культуральные инактивированные вакцины [3]. Исследования по разработке вакцин для ранней защиты подтверждают, что при их использовании происходит выработка вируснейтрализующих антител у естественно восприимчивых животных в зоне вспышки, что служит защитой от заражения ящуром, приводит к сдерживанию инфекции и ее купированию в первичном очаге [1, 2, 7].

Цель работы заключалась в исследовании гуморального и протективного иммунитета при формировании ранней защиты у естественно восприимчивых животных в ответ на введение инактивированной эмульсионной противоящурной вакцины из штамма О/Монголия/2017 против гомологичного штамма, а также вакцин из штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 против гетерологичного штамма О/Монголия/2017.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Для изучения гуморального иммунитета применяли гомологичный штамм О/Монголия/2017 и гетерологичные штаммы О/Приморский/2012, О/Саудовская Аравия/08 культурального вируса ящура.

Для контрольного заражения естественно восприимчивых животных применяли адаптированный к этим животным афтозный вирус ящура штамма О/Монголия/2017.

Клеточные линии. Для репродукции вируса использовали монослойные перевиваемые клеточ-

ные линии из почки сибирского горного козерога (ПСГК-30), почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21). Для оценки титра противоящурных антител и авирулентности антигена после инактивации применяли первичную монослойную культуру клеток из свиной почки (СП).

Животные. В исследованиях использовали: 1) 26 голов крупного рогатого скота (КРС) голштино-фризской породы массой 250–300 кг; 2) 16 свиней различных пород массой 30–40 кг; 3) 4 овцы романовской породы массой 20–30 кг.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33216-2014), принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2012 по охране животных, используемых в научных целях.

Инактивация вируса, очистка и концентрирование антигена. Инактивацию вируса ящура проводили с помощью раствора аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ). Для очистки антигена от балластных белков, в том числе неструктурных протеинов, применяли раствор полигексаметиленгуанидина (ПГМГ). Концентрирование проводили методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке.

Определение компонентного состава инаktivированной суспензии. В инаktivированной суспензии количество иммуногенных компонентов оценивали в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению концентрации 146S, 75S, 12S компонентов вакцинных штаммов культурального вируса ящура в реакции связывания комплемента (РСК)» [8].

Подбор адъюванта и соотношения «антиген – адъювант». Для изготовления моновалентных эмульсионных вакцин против ящура в качестве адъюванта был выбран Montanide ISA 206 VG, поскольку из литературных источников известно, что он способствует выработке антител на 4–7-е сут после иммунизации [5, 9]. Соотношение антигена и адъюванта составляло 50:50.

Вакцины. Для исследования иммуногенной активности эмульсионных противоящурных вакцин было изготовлено 3 образца, которые применяли однократно внутримышечно в дозе 2 см³, и в двойной дозе – внутримышечно в две точки по 2 см³.

Первая вакцина содержала штамм вируса ящура О/Монголия/2017. В двойной дозе (4 см³) количество 146S компонента составляло 24,22 мкг, а в одной дозе (2 см³) – 12,11 мкг.

Вторая вакцина включала в состав штамм вируса ящура О/Саудовская Аравия/08 с содержанием 146S компонента в дозе 4 см³ – 30,1 мкг.

Третья вакцина включала в состав штамм О/Приморский/2012 с количеством 146S частиц в двойной дозе (4 см³), равным 29,2 мкг.

Контрольное заражение. Через 7 сут после вакцинации проводили контрольное заражение животных адаптированным вирусом ящура штамма О/Монголия/2017. Заражение осуществляли в слизистую языка в дозе 10⁴ ИД₅₀/0,20 см³ (в две точки по 0,10 ± 0,05 см³).

Отбор крови. Через 4 и 7 сут после вакцинации у животных отбирали кровь для исследования.

Определение титра вируснейтрализующих антител. Количество вируснейтрализующих антител (ВНА) в пробах сыворотки крови определяли в реакции нейтрализации (РН) с использованием монослоя культуры клеток СП по общепринятой методике [10].

Оценка авирулентности антигена вируса. Авирулентность инаktivированного вируса контролировали с помощью инокуляции в монослойную культуру клеток СП.

Оценка иммуногенности вакцины. Иммуногенность вакцины исследовали на КРС и свиньях. На овцах определяли уровень гуморального иммунитета в реакции нейтрализации. Полученные спустя 4 и 7 сут после иммунизации животных сыворотки крови анализировали в РН. Затем КРС и свиней заражали контрольным штаммом О/Монголия/2017 вируса ящура, спустя 7 сут всех животных подвергали эвтаназии и проводили патолого-анатомический осмотр. Защищенными от ящура считали животных, у которых на конечностях отсутствовали поражения. Первичные афты не учитывали.

Статистическая обработка данных. Все измерения проводили в трех повторностях. Полученные результаты статистически обрабатывали, определяя средние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера, а также коэффициент детерминации [11]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы проводили иммунизацию свиней моновалентными эмульсионными противоящурными вакцинами из штаммов О/Монголия/2017, О/Приморский/2012, О/Саудовская Аравия/08 с последующей оценкой формирования раннего иммунитета против гомологичных и гетерологичных штаммов. Результаты исследования представлены на рисунке 1.

На рисунке 1 показано, что у животных, иммунизированных вакциной из штамма О/Саудовская Аравия/08, титры антител против гомологичного штамма с 4-х по 7-е сут после вакцинации выросли в 1,3 раза. Титры антител против гетерологичных штаммов вируса ящура О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017 на 4-е сут после иммунизации были в 2,1 и в 1,9 раза ниже по сравнению с гомологичным штаммом и составили $1,95 \pm 0,10$ и $2,05 \pm 0,17 \log_2$ соответственно. На 7-е сут после инокуляции титры ВНА против гетерологичных штаммов О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017 были в 2,5 и 2,1 раза ниже, чем против гомологичного, и соответствовали значениям $2,10 \pm 0,10$ и $2,35 \pm 0,10 \log_2$.

У свиней, привитых вакциной из штамма О/Приморский/2012, количество антител против гомологичного штамма на 4-е сут после иммунизации составило $3,35 \pm 0,17 \log_2$, против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017 – $2,30 \pm 0,22$ и $3,25 \pm 0,18 \log_2$. Переведа $\log_2$ в натуральные числа, можно отметить, что на 4-е сут титры антител против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017 были ниже в 2,1 и 1,1 раза соответственно по сравнению с гомологичным штаммом. Различие между уровнем гуморального иммунитета против гомологичного вируса ящура О/Приморский/2012 и гетерологичного штамма О/Монголия/2017

Рис. 1. Динамика образования ВНА у свиней после применения вакцин из штаммов О/Саудовская Аравия/08, О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017 в двойной дозе (4 см^3) против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса ящура на 4-е и 7-е сут после вакцинации

Fig. 1. Dynamics of VNA formation in pigs after use of vaccines based on O/Saudi Arabia/08, O/Primorsky/2012 and O/Mongolia/2017 strains in a double dose (4 см^3) against homologous and heterologous FMDV strains, day 4 and 7 post-vaccination

несущественно. На 7-е сут после иммунизации количество антител против гомологичного штамма было $4,20 \pm 0,29 \log_2$, что в 1,8 раза выше, чем на 4-е сут после вакцинации. Уровень антител на 7-е сут после вакцинации против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017 был ниже в 2,4 и 1,5 раза соответственно.

У свиней, иммунизированных вакциной из штамма О/Монголия/2017, на 4-е и 7-е сут после инокуляции титры антител против гомологичного штамма составили $3,00 \pm 0,36$ и $3,90 \pm 0,30 \log_2$ соответственно. На 7-е сут количество антител против гомологичного штамма увеличилось в 1,9 раза. Содержание антител против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 на 4-е сут после вакцинации в сыворотках крови составило $1,50 \pm 0,18$ и $1,75 \pm 0,18 \log_2$, что в 2,8 и 2,4 раза ниже, чем против гомологичного штамма. На 7-е сут после иммунизации титры ВНА против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 были в 3,7 и 1,6 раза ниже по сравнению с данными для гомологичного штамма и составили $2,00 \pm 0,17$ и $3,25 \pm 0,20 \log_2$ соответственно.

Как следует из рисунка 1, уровень гуморального иммунитета у свиней, привитых моновалентными противоящурными вакцинами для ранней защиты, повышается к 7-м сут после вакцинации. Изготовленные препараты обладают лучшей иммуногенной активностью преимущественно в отношении гомологичных штаммов. В дальнейших опытах для оценки протектив-

ного иммунитета через 7 сут после вакцинации проводили заражение свиней штаммом О/Монголия/2017. В качестве контроля использовали одно невакцинированное животное. Результаты контрольного заражения представлены в таблице 1.

По данным таблицы 1 видно, что у животных, иммунизированных вакцинами из штаммов О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017, после контрольного заражения характерных признаков ящура не наблюдалось. Эмульсионная противоящурная вакцина из штамма О/Саудовская Аравия/08 через 7 сут после введения препарата и последующего заражения не обеспечила защиту 1 из 5 голов свиней. Титр ВНА у заболевшего животного составил $2,00 \log_2$. Контрольное животное также заболело ящуром.

Следующий этап работы был посвящен сравнительному анализу формирования раннего иммунитета у КРС после введения одной и двойной доз моновалентных эмульсионных противоящурных вакцин. Оценивали уровни антител в крови иммунизированных животных против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса ящура. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

Из данных, представленных на рисунке 2, видно, что при введении КРС моновалентной эмульсионной противоящурной вакцины из штамма О/Монголия/2017 в дозе 2 см^3 на 4-е сут титры антител против гомологичного штамма составили $2,83 \pm 0,33 \log_2$, а при иммунизации в дозе 4 см^3 – $3,46 \pm 0,24 \log_2$. При введении препарата в дозе 2 см^3 на 4-е сут после вакцинации

Таблица 1

Исследование гуморального и протективного иммунитета свиней, вакцинированных двойной дозой инактивированных эмульсионных вакцин против ящура

Table 1

Study of humoral and protective immunity in pigs vaccinated with a double dose of inactivated emulsion vaccines against FMD

Вакцинный штамм	Титры антител против вируса ящура, $\log_2(M \pm m)$						Результаты заражения штаммом О/Монголия/17 через 7 сут после вакцинации (заражено/защищено)
	4-е сут после вакцинации			7-е сут после вакцинации			
	О/Сауд. Аравия/08	О/Приморский/12	О/Монголия/17	О/Сауд. Аравия/08	О/Приморский/12	О/Монголия/17	
О/Сауд. Аравия/08	3,00 ± 0,38	1,95 ± 0,10	2,05 ± 0,17	3,40 ± 0,36	2,10 ± 0,10	2,35 ± 0,35	5/4
О/Приморский/12	2,30 ± 0,22	3,35 ± 0,17	3,25 ± 0,18	2,95 ± 0,15	4,20 ± 0,29	3,60 ± 0,27	5/5
О/Монголия/17	1,50 ± 0,18	1,75 ± 0,18	3,00 ± 0,36	2,00 ± 0,33	3,25 ± 0,26	3,90 ± 0,30	5/5
Контроль							1/0

содержание антител против гомологичного штамма было в 1,6 раза ниже по сравнению с применением двойной дозы.

На 7-е сут после иммунизации одной дозой уровень ВНА против штамма О/Монголия/2017 составил $4,67 \pm 0,23 \log_2$, а двойной – $5,00 \pm 0,21 \log_2$, что является несущественной разницей. При введении вакцины количество ВНА против гомологичного штамма на 7-е сут увеличилось в 3,6 раза по сравнению с данными,

полученными на 4-е сут после введения препарата. При использовании двойной дозы вакцины с 4-х по 7-е сут после иммунизации отмечалось увеличение титра антител против штамма О/Монголия/2017 в 2,9 раза.

При введении вакцины из штамма О/Монголия/2017 в дозе 2 см³ на 4-е сут после иммунизации КРС уровень ВНА против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 составлял $2,21 \pm 0,41$ и $2,46 \pm 0,29 \log_2$ соответственно. Количество

Рис. 2. Динамика образования ВНА у КРС после применения одной и двойной дозы вакцины из штамма О/Монголия/2017, двойной дозы вакцин из штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 против гомологичного и гетерологичных штаммов вируса ящура на 4-е и 7-е сут после вакцинации

Fig. 2. Dynamics of VNA formation in cattle after administration of a single or double dose of the vaccine based on O/Mongolia/2017 strain, double dose of vaccines based on O/Saudi Arabia/08 and O/Primorsky/2012 strains against homologous and heterologous FMDV strains, day 4 and 7 post-vaccination

антител против гомологичного штамма находилось на уровне $2,83 \pm 0,24 \log_2$, что в 1,5 и 1,3 раза выше, чем против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 соответственно.

Выявлено, что на 4-е сут после введения двойной дозы моновалентной эмульсионной вакцины из штамма О/Монголия/2017 уровень ВНА против гомологичного штамма составил $3,46 \pm 0,19 \log_2$, против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 – $3,21 \pm 0,33$ и $3,21 \pm 0,22 \log_2$ соответственно. Иными словами, значения титров антител при введении данной вакцины в дозе 4 см^3 против гомологичного штамма были в 1,2 раза больше, чем против гетерологичного.

На 7-е сут после введения одной дозы вакцины из штамма О/Монголия/2017 уровень ВНА против гомологичного штамма составлял $4,67 \pm 0,23 \log_2$, а против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 соответствовал значениям $3,58 \pm 0,12$ и $3,92 \pm 0,19 \log_2$. Таким образом, на 7-е сут после иммунизации количество антител против гомологичного штамма превышало содержание ВНА против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 в 2,1 и 1,7 раза соответственно.

После введения данного вакцинного препарата в дозе 4 см^3 на 7-е сут титр антител против гомологичного штамма О/Монголия/2017 составил $5,00 \pm 0,22 \log_2$, против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 – $4,46 \pm 0,33$ и $4,33 \pm 0,22 \log_2$ соответственно. То есть на 7-е сут после введения двойной дозы вакцины из штамма О/Монголия/2017 уровень антител против гетерологичных штаммов практически не отличался от титра ВНА против гомологичного штамма. Следует отметить, что иммунизация КРС в двойной дозе по сравнению с введением одной дозы вакцины позволила на

7-е сут увеличить количество антител против штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 в 1,8 и 1,3 раза соответственно.

Из данных, представленных на рисунке 2, следует, что у КРС, привитых двойной дозой эмульсионной противоящурной вакциной из штамма О/Саудовская Аравия/08, на 4-е и 7-е сут после инокуляции уровень антител составлял $2,42 \pm 0,14$ и $4,92 \pm 0,15 \log_2$ соответственно. Значения титров антител с 4-х по 7-е сут после иммунизации увеличились в 5,7 раза.

На 4-е сут после введения данной вакцины титры антител против гетерологичных штаммов О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017 составляли $1,88 \pm 0,15$ и $2,00 \pm 0,35 \log_2$ соответственно. Степень различия между титрами антител против гомологичного и гетерологичных штаммов составила 1,5 и 1,3 раза соответственно.

На 7-е сут после вакцинации этим же препаратом количество ВНА против гетерологичных штаммов О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017 соответствовало значениям $3,33 \pm 0,19$ и $2,83 \pm 0,12 \log_2$, что в 3,0 и 4,3 раза ниже по сравнению с титрами антител против гомологичного штамма.

У животных, привитых моновалентной эмульсионной вакциной из штамма О/Приморский/2012 в дозе 4 см^3 , титры антител против гомологичного штамма на 4-е и 7-е сут после иммунизации составили $2,25 \pm 0,14$ и $4,13 \pm 0,11 \log_2$ соответственно. Активность гуморального иммунитета КРС против гомологичного штамма с 4-х по 7-е сут возросла в 3,7 раза.

На 4-е сут после введения данной вакцины количество ВНА против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017 составляло $1,75 \pm 0,13$ и $1,79 \pm 0,10 \log_2$ соответственно, что в 1,4 раза ниже, чем против гомологичного штамма. На 7-е сут после иммунизации титры антител против гетерологичных штаммов соответствовали значениям

Таблица 2

Исследование гуморального и протективного иммунитета у КРС, привитых моновалентными эмульсионными вакцинами против ящура

Table 2

Study of humoral and protective immunity in cattle vaccinated with monovalent emulsion vaccines against FMD

Вакцинный штамм, доза	Титры антител против вируса ящура, $\log_2(M \pm m)$						Результаты заражения штаммом О/Монголия/17 через 7 сут после вакцинации (заражено/защищено)
	4-е сут после вакцинации			7-е сут после вакцинации			
	О/Сауд. Аравия/08	О/Приморский/12	О/Монголия/17	О/Сауд. Аравия/08	О/Приморский/12	О/Монголия/17	
О/Монголия/17 2 см ³	2,21 ± 0,41	2,46 ± 0,29	2,83 ± 0,33	3,58 ± 0,12	3,92 ± 0,19	4,67 ± 0,23	6/6
О/Монголия/17 4 см ³	3,21 ± 0,33	3,21 ± 0,22	3,46 ± 0,24	4,46 ± 0,12	4,33 ± 0,11	5,00 ± 0,21	6/6
О/Сауд. Аравия/08 4 см ³	2,42 ± 0,14	1,88 ± 0,15	2,00 ± 0,22	4,92 ± 0,15	3,33 ± 0,19	2,83 ± 0,12	6/5
О/Приморский/12 4 см ³	1,75 ± 0,13	2,25 ± 0,14	1,79 ± 0,10	3,29 ± 0,12	4,13 ± 0,11	3,46 ± 0,10	6/6
Контроль 1							1/0
Контроль 2							1/0

Таблица 3

Исследование гуморального иммунитета у овец, привитых противоящурной инактивированной эмульсионной вакциной из штамма О/Монголия/2017

Table 3

Study of humoral and protective immunity in sheep vaccinated with inactivated emulsion vaccine against FMD based on O/Mongolia/2017 strain

Вакцинный штамм	Доза	Номер животного	Титры ВНА на 4-е сут после вакцинации ($\log_2$) против штаммов вируса ящура		
			О/Сауд. Аравия/08	О/Приморский/12	О/Монголия/17
О/Монголия/17	4 см ³	1	2,50	3,00	3,75
		2	3,25	2,75	3,75
		3	3,00	3,50	3,50
		4	3,00	3,75	4,00
		$M \pm m$	$2,94 \pm 0,38$	$3,25 \pm 0,38$	$3,75 \pm 0,14$

$3,29 \pm 0,12$ и $3,46 \pm 0,10 \log_2$. Таким образом, количество антител против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Монголия/2017 снизилось в 1,8 и 1,6 раза по сравнению с данными для гомологичного штамма.

Результаты исследования протективного иммунитета на 7-е сут после вакцинации у КРС, привитых моновалентными противоящурными вакцинами, представлены в таблице 2. В качестве контроля использовали двух невакцинированных животных.

Согласно таблице 2 после введения моновалентной эмульсионной вакцины из штамма О/Монголия/2017 в дозе 2 см³ отмечалась выработка ВНА в титрах, достаточных для защиты от прямого заражения гомологичным штаммом. Результаты контрольного заражения штаммом О/Монголия/2017 через 7 сут после вакцинации показали, что у всех шести животных, иммунизированных двойной дозой вакцин из штаммов О/Приморский/2012 и О/Монголия/2017, характерные признаки ящура отсутствовали. Эмульсионная противоящурная вакцина из штамма О/Саудовская Аравия/08 через 7 сут после введения не обеспечила защиту от заражения одной из шести голов КРС. Заболевшее животное на 7-е сут после вакцинации имело титр ВНА, равный $2,75 \log_2$. У двух контрольных животных также были обнаружены признаки ящура.

На следующем этапе работы проводили исследование формирования раннего иммунитета у овец после иммунизации моновалентной эмульсионной противоящурной вакциной из штамма О/Монголия/2017 в дозе 4 см³. Оценка иммунного статуса овец была затруднена из-за отсутствия вируса, адаптированного к этому виду животных, вследствие чего контрольное заражение не проводилось. Результаты определения титра ВНА на 4-е сут после иммунизации животных отражены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что на 4-е сут после иммунизации уровень антител против гомологичного штамма составил $3,75 \pm 0,14 \log_2$. Титры ВНА против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 соответствовали значениям $2,94 \pm 0,38$ и $3,25 \pm 0,38 \log_2$ соответственно. Таким образом, на 4-е сут после введения вакцинного препарата у овец был сформирован ранний иммунитет,

активность которого против гетерологичных штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 по сравнению с гомологичным штаммом была ниже в 1,8 и 1,4 раза. Иными словами, применение противоящурной инактивированной эмульсионной вакцины из штамма О/Монголия/2017 способствует формированию иммунитета у овец в ранние сроки после введения препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по изучению формирования раннего иммунитета у естественно восприимчивых животных против ящура типа О свидетельствуют о том, что противоящурная инактивированная эмульсионная вакцина из штамма О/Монголия/2017 на 7-е сут после введения двойной дозы свиньям индуцировала выработку вируснейтрализующих антител в количестве $3,90 \pm 0,30 \log_2$. На 7-е сут после иммунизации КРС данной вакциной в дозе 2 см³ титр ВНА против гомологичного штамма соответствовал значению $4,67 \pm 0,23 \log_2$, в дозе 4 см³ – $5,00 \pm 0,21 \log_2$. Результаты контрольного заражения КРС и свиней штаммом О/Монголия/2017 через 7 сут после иммунизации показали, что у всех животных, привитых вакциной из гомологичного вируса, генерализованные признаки ящура отсутствовали.

При введении двойной дозы противоящурной инактивированной эмульсионной вакцины из штамма О/Приморский/2012 на 7-е сут после иммунизации титр ВНА у свиней против гетерологичного штамма О/Монголия/2017 был равен $3,60 \pm 0,27 \log_2$, а у КРС – $3,46 \pm 0,10 \log_2$. По результатам контрольного заражения все животные, привитые противоящурной вакциной из штамма О/Приморский/2012, были защищены от штамма О/Монголия/2017 вируса ящура.

Противоящурная инактивированная эмульсионная вакцина из штамма О/Саудовская Аравия/08 через 7 сут после введения в дозе 4 см³ способствовала выработке ВНА против штамма О/Монголия/2017 у свиней в количестве $2,35 \pm 0,35 \log_2$, у КРС – $2,83 \pm 0,12 \log_2$. При этом по итогам контрольного заражения штаммом О/Монголия/2017 вируса ящура иммунизация данной вакциной в двойной дозе не обеспечила защиту одного из пяти подсвинков и одной из шести голов КРС. У заболевших

животных на 7-е сут после вакцинации титры ВНА составляли $2,75 \log_2$ (КРС) и $2,00 \log_2$ (свинья).

На 4-е сут после иммунизации овец противоящурной инактивированной эмульсионной вакциной из штамма О/Монголия/2017 в дозе 4 см^3 титр ВНА против гомологичного штамма составлял $3,75 \pm 0,14 \log_2$, что свидетельствовало о способности данного препарата формировать ранний иммунитет. Уровень гуморального иммунитета у овец, привитых данной вакциной, против штаммов О/Саудовская Аравия/08 и О/Приморский/2012 был ниже в 1,8 и 1,4 раза по сравнению с гомологичным штаммом. Исследования, проведенные на КРС, позволяют предположить, что противоящурная инактивированная эмульсионная вакцина из штамма О/Монголия/2017 может обеспечить формирование протективного иммунитета и у овец.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–3, 5, 7, 9 см. REFERENCES)

4. Дудников А. И. Ранняя защита после противоящурной иммунизации. Ветеринарная медицина: міжвід. тем. наук. зб. Харків; 2008; 91: 189–191.
6. Михалишин Д. В., Лезова Т. Н., Ходалова Н. Н., Борисов А. В., Ключкина Н. Д., Стариков В. А., Михалишин В. В., Балашов А. Н. Динамика развития противоящурного гуморального иммунитета у крупного рогатого скота, иммунизированного трехвалентной сорбированной вакциной типов А, О, Азия-1. Труды Федерального центра охраны здоровья животных; 2007; 5: 75–82. eLIBRARY ID: 14454047.
8. Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Шишкова А. А., Доронин М. И., Медведева Н. Н., Негазина Н. Н., Петерс М. А. Методические рекомендации по определению концентрации 146S, 75S, 12S компонентов вакцинных штаммов культурального вируса ящура в реакции связывания комплемента (РСК): утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 21.09.2017 (№ 39-17). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2017. 51 с.
10. Методические указания по постановке реакции нейтритализации для определения статуса животных при ящуре: утв. ГУВ МСХ СССР 26.12.83 115-6а.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.

REFERENCES

1. Barnett P., Garland J. M., Kitching R. P., Scherbrucker C. G. Aspects of emergency vaccination against foot-and-mouth disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 25 (5–6): 345–364. DOI: 10.1016/s0147-9571(02)00031-0.

2. Quattrocchi V., Pappalardo J. S., Langellotti C., Smitsaert E., Fondevila N., Zamorano P. Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. *Vaccine*. 2014; 32 (19): 2167–2172. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.061.
3. Salt J. S., Barnett P. V., Dani P., Williams L. Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine*. 1998; 16 (7): 746–754. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)86180-4.
4. Dudnikov A. I. Early protection following FMD immunization [Ranaya zashchita posle protivoyashchurnoj immunizacii]. *Veterinarna medicina: mizhvid. tem. nauk. zb.* Kharkiv; 2008; 91: 189–191. (in Russian)
5. Golde W. T., Pacheco J. M., Duque H., Doel T., Penfold B., Ferman G. S., Gregg D. R., Rodriguez L. L. Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: Use in emergency outbreak response. *Vaccine*. 2005; 23 (50): 5775–5782. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.07.043.
6. Mikhilishin D. V., Lyozova T. N., Khodakova N. N., Borisov A. V., Klyukina N. D., Starikov V. A., Mikhilishin V. V., Balashov A. N. Dynamics of anti-FMD humoral immunity in cattle immunized with trivalent type A, O, Asia-1 sorbated vaccine. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2007; 5: 75–82. eLIBRARY ID: 14454047. (in Russian)
7. Horsington J., Zhang Z., Bittner H., Hole K., Singanallur N. B., Alexandersen S., Vosloo W. Early protection in sheep against intratypic heterologous challenge with serotype O foot-and-mouth disease virus using high-potency, emergency vaccine. *Vaccine*. 2015; 33 (3): 422–429. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.11.043.
8. Lozovoy D. A., Mikhilishin D. V., Starikov V. A., Shishkova A. A., Doronin M. I., Medvedeva N. N., Negazina N. N., Peters M. A. Methodical recommendations for determination of concentration of 146S, 75S, 12S components of vaccine strains of culture FMD virus in complement fixation test (CFT) [Metodicheskie rekomendacii po opredeleniyu koncentracii 146S, 75S, 12S komponentov vakcinnnyh shtamov kul'tural'nogo virusa yashchura v reakcii svyazyvaniya komplementa (RSK)]: adopted by FGBI "ARRIAH", 21.09.2017 (No. 39-17). Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2017. 51 p. (in Russian)
9. Cox S. J., Barnett P. V. Experimental evaluation of foot-and-mouth disease vaccines for emergency use in ruminants and pigs: a review. *Vet. Res.* 2009; 40 (3): 13. DOI: 10.1051/vetres:2008051.
10. Methodical guidelines for neutralization test for determination of animals' status in case of FMD [Metodicheskie ukazaniya po postanovke reakcii neytralizacii dlya opredeleniya statusa zhivotnykh pri yashchure]: adopted by General Veterinary Administration of MoA USSR 26.12.83 115-6a. (in Russian)
11. Lakin G. F. Biometrics [Biometriya]: Study guide. 4th ed. updated and revised. M.: Higher School; 1990. 352 p. (in Russian)

Поступила 19.12.2019

Принята в печать 02.03.2020

Received on 19.12.2019

Approved for publication on 02.03.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Александрович, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Стариков Вячеслав Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Елькина Юлия Сергеевна, аспирант, технолог лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Dmitry V. Mikhilishin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vyacheslav A. Starikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yulia S. El'kina, Post-Graduate Student, Technologist, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.