

На правах рукописи

ЕЛЬКИНА Юлия Сергеевна

**ПРОТИВОЯЩУРНЫЕ ВАКЦИНЫ ТИПОВ О, АЗИЯ-1, А
ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ РАННЕГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ**

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Владимир – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

**Научный
руководитель**

Михалишин Дмитрий Валерьевич
доктор ветеринарных наук

**Официальные
оппоненты:**

Гринь Светлана Анатольевна доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»;

Капустина Ольга Владимировна доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», г. Москва.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», г. Покров

Защита состоится _____ в _____ час на заседании диссертационного совета 36.1.002.01 (Д 220.015.01) при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.arriah.ru ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Автореферат разослан _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание, поражающее как диких, так и домашних парнокопытных животных. Ящур считается одним из наиболее экономически важных заболеваний скота из-за его способности заражать множество видов, влиять на продуктивность животных и быстро распространяться внутри и между географическими регионами (Кременчугская С.Р., 2018; Bachanek-Bankowska K. et al., 2018).

Стратегия экстренной, вынужденной вакцинации при заносе возбудителя на территорию России приобретает особую важность, основанием для которой является необходимость создания ранней защиты всех восприимчивых животных.

Для улучшения мер борьбы с заболеванием в энзоотичных странах важно отслеживать текущие варианты распространения полевых изолятов вируса ящура для обеспечения того, чтобы в короткие сроки иметь возможность исследования биологических свойств интересующего изолята и разработать эффективную вакцину из вызвавшего вспышку вируса (Barnett P. et al., 2002; Brown F., 2002; Salt I.S., 1998; William T.G. et al., 2005).

Существует угроза заноса штаммов вируса ящура генетических линий O/ME-SA/Ind 2001, Азия-1/ASIA/Sindh-08, A/AFRICA/G-IV на территорию РФ. Вирус ящура O/MOG/13/2017 генетической линии O/ME-SA/Ind 2001 имеет тенденцию к распространению в странах Юго-Восточной Азии. Изолят Азия-1 Пакистан/2018, принадлежащий родословной Азия-1/ASIA/Sindh-08, вызвал вспышку ящура в 2018 году в Пакистане и до сих пор представляет угрозу распространения ящура типа Азия-1 в странах Западной и Центральной Азии. Изолят A/EGY/2/2018 генетической линии A/AFRICA/G-IV был нотифицирован в 2017-2018 годах во многих странах Северо-Восточной Африки, активно развивающих индустрию туризма и имеющих торгово-экономические связи с Россией, вследствие чего всегда существует риск заноса заболевания на территорию РФ (<https://www.wrlfmd.org>).

Изготовление профилактических препаратов из новых антигенно различающихся штаммов вируса ящура, способных сформировать напряженный иммунитет у естественно восприимчивых животных на ранних сроках после вакцинации, является актуальной задачей наших исследований.

Степень разработанности темы. Быстрая защита против ящура представляет принципиально новую стратегию вакцинопрофилактики и является следствием специфического устранения врожденной (видовой) восприимчивости организма к определенному заболеванию (Багаев А.В. и др., 2015). Разработке противоящурных вакцин для формирования раннего иммунитета у животных, а также усовершенствованию стратегий борьбы с внезапно возникающими вспышками заболевания, проведения экстренной вакцинации и поддержания статуса благополучия на территории стран, граничащих с эндемичными по ящуру

государствами, посвящены исследования многих ученых: Cox S.I. et al., 2009; Дудников А.И. и др., 2008. Однако в доступной литературе представлено недостаточно информации об обосновании быстрой подготовки изолятов в качестве кандидатов для изготовления вакцин, о количестве иммуногенных компонентов, необходимых для индуцирования защитного иммунитета у животных через 4-7 дней после вакцинации, а также об использовании эффективных адъювантов в препаратах.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы являлась разработка противоящурных вакцин для ранней защиты из новых штаммов генетических линий O/ME-SA/Ind 2001, Азия-1/ASIA/Sindh-08, A/AFRICA/G-IV и их испытание на естественно восприимчивых животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

– адаптировать изоляты вируса ящура O/MOG/13/2017 (O/ME-SA/Ind 2001), Азия-1 Пакистан/2018 (Азия-1/ASIA/Sindh-08), A/EGY/2/2018 (A/AFRICA/G-IV) к производственным культурам клеток (ПСГК-30, IB-RS-2, СП и ВНК-21) для получения посевного вируса штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV;

– подготовить индикаторные штаммы вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV для проверки иммуногенной активности вакцин и уровней гуморального иммунитета у естественно восприимчивых животных;

– отработать технологические режимы инактивации, очистки и концентрирования антигенов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV при изготовлении вакцин для ранней защиты;

– изготовить опытные образцы эмульсионных вакцин с различным содержанием иммуногенных компонентов из штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV;

– изучить антигенные и протективные свойства изготовленных вакцин на естественно восприимчивых сельскохозяйственных животных на 4-7 сутки после вакцинации.

Научная новизна исследования. Научная новизна состоит в том, что:

– изучены культуральные свойства вируса ящура O/MOG/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018, A/EGY/2/2018;

– получены индикаторные штаммы О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV с целью проверки иммуногенной активности вакцин для свиней и крупного рогатого скота;

- отработаны режимы инактивации, концентрирования и очистки вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV;
- изготовлены экспериментальные образцы инаktivированных эмульсионных противоящурных вакцин для ранней защиты из штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV;
- определено количество 146+75S компонентов в вакцине, формирующее иммунную защиту через 7 суток после вакцинации против гомологичного штамма вируса ящура О №2344/Монголия/2017;
- определено количество иммуногенных компонентов, индуцирующих защиту у животных на 4 сутки после вакцинации против гомологичных штаммов вируса ящура Азия-1 №2356/14/18 и А №2205/G-IV.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследования проводились в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015-2020 годы)» по государственным контрактам №15/18 от 20.03.2018, №25/19 от 01.04.2019, №10/20 от 02.03.2020 на 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.

На основании результатов проведенных исследований подготовлены «Методические рекомендации по определению титра инфекционной активности культурального вируса ящура в сырье для вакцины методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)»; получен патент на изобретение № 2741639 «Вакцина для ранней защиты против ящура типа Азия-1 инаktivированная эмульсионная»; оформлена заявка № 2021113565 от 12.05.2021 на получение патента «Вакцина для ранней защиты против ящура из штамма А №2205/G-IV культуральная инаktivированная эмульсионная».

Методология и методы исследований. В работе использованы вирусологические, серологические и иммунологические методы исследований с использованием клеточных культур, лабораторных и естественно восприимчивых к ящуру животных.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты адаптации изолятов О/MOG/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018, А/EGY/2/2018 к культурам клеток ПСГК-30, IB-RS-2, СП, ВНК-21;
- подготовка индикаторных штаммов вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV на КРС и свиньях;

– результаты инактивации, очистки и концентрирования штаммов вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV;

– количество иммуногенных компонентов в эмульсионной вакцине, индуцирующих иммунитет через 4-7 суток после вакцинации против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса ящура.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность за консультативную, научно-методическую и практическую помощь в выполнении отдельных этапов работы коллективу лаборатории профилактики ящура, д-ру ветеринарн. наук Михалишину Д.В., канд. биол. наук Доронину М.И., канд. ветеринарн. наук Борисову А.В., канд. биол. наук Жбановой Т.В. и сотрудникам научной библиотеки ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Степень достоверности и апробации результатов исследования. Результаты проведенных исследований получены с использованием стандартных методик и других нормативных документов и большого объема экспериментального материала. Степень достоверности результатов экспериментов подтверждена обработкой их статистическими методами и комиссионными испытаниями.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях методической комиссии и Ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2017г. по 2020 г., на Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ивана Васильевича Звягина (ФГБНУ ВНИТИБП, 2020г.). По материалам диссертации опубликовано шесть научных работ, из которых четыре статьи в рецензируемых изданиях, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки России и патент на изобретение № 2741639.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах компьютерного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы, приложения; иллюстрирована 27 таблицами и 12 рисунками. Список использованной литературы включает 176 источников, из них 109 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы

Вирус. В работе использовали следующие типы и штаммы: О №2344/Монголия/2017, О №2147/Приморский/2012, О №2047/Саудовская Аравия/08, Азия-1 №2356/14/18, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011, Азия-1 №1946/Шамир Израиль 3/89, Азия-1 №2109/Пакистан/2009, Азия-1/ Иран 58/99,

Азия-1 №1987/Амурский/2005, А №2205/G-IV. А₂₂ №550/Азербайджан/64, А₂₂ Ирак 24/64, А №2248/Египет/18//2012, А №2029/Турция/06, А №2269/ВНИИЗЖ/2015, А №2155/Забайкальский/2013.

Животные. В исследованиях использовали крупный рогатый скот (КРС) голштино-фризской породы массой по 250-300 кг, свиней различных пород массой по 30-40 кг, овец романовской породы массой по 20-30 кг.

Клеточные линии. В работе использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), монослойную первично-трипсинизированную культуру клеток из почки свиньи (СП), монослойную перевиваемую культуру клеток из почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почки свиньи (IB-RS-2), монослойную перевиваемую клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21).

Адьюванты. Для изготовления эмульсионных вакцин в качестве адьюванта был выбран Montanide ISA-206 VG (соотношение 50:50 по массе).

Растворы и реактивы. В работе использовали: питательные среды: Игла МЕМ, а также растворы Эрла или Хенкса с добавлением гидролизата белков крови (ГБК) и фетальной сыворотки крови КРС; фосфатно-буферный раствор 1/15М рН 7,4-7,6; 15-20%-й раствор аминоксилэтиленимина (АЭЭИ); уксусную кислоту, ледяную, ХЧ, ГОСТ 61-75; хлороформ, ГОСТ 20015-88 или ТУ 6-09-4263-76; полисепт (полигексаметиленгуанидин (ПГМГ)) производства ПЗБ, г. Покров.

2.2 Методы

Определение титра инфекционной активности. Для определения титра инфекционной активности ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) культурального вируса ящура применяли монослойную культуру клеток СП. Расчеты осуществляли по общепринятой методике Кербера.

Инактивация и очистка антигена вируса. Инактивацию вируса ящура проводили с помощью 0,03% раствора АЭЭИ при рН-7,2-7,8 в течение 12 часов и температуре 37°C. Для очистки антигенсодержащей суспензии от балластных белков, в т.ч. неструктурных протеинов, применяли 0,007% р-р полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) с последующей декантацией надосадочной жидкости.

Концентрирование антигена. Вирусный антиген концентрировали методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке с использованием кассеты тангенциальной фильтрации Omega Centrasette TR=70 кД, S=0,1. Кратность концентрирования 5-20 раз по объему.

Определение количества иммуногенных компонентов. В неинактивированной суспензии культурального вируса ящура количество полных вирусных частиц определяли в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению 146S компонента вакцинных штаммов культурального вируса ящура в обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени». В инактивированной 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)».

Реакция нейтрализации. Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) использовали реакцию нейтрализации (РН). Постановку РН осуществляли на культуре клеток СП по общепринятой методике с двукратным разведением исследуемых сывороток и постоянной дозой вируса соответствующего штамма (100 ТЦД₅₀).

Определение стерильности вакцин. Биологический контроль на стерильность питательных сред, суспензий культуры клеток, антигена и готовых вакцин осуществляли в соответствии с ГОСТом 280085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Определение авирулентности инактивированного антигена вируса ящура. Авирулентность суспензии инактивированного вируса ящура контролировали с помощью инокуляции монослоя культуры клеток СП (3 последовательных пассажа).

Изготовление моновалентных эмульсионных вакцин. При изготовлении эмульсионных вакцин использовали инактивированную антигенсодержащую суспензию, которую концентрировали при помощи проточной ультрафильтрации. Полученные концентраты антигена хранили при 2-8°C до изготовления образцов вакцины. Концентраты антигенов и адьюванта Montanide ISA-206 VG диспергировали в соотношении 50:50 по массе.

Контроль иммуногенности вакцин. При определении иммуногенности вакцин руководствовались СТО 00495527-0065-2012 «Вакцина против ящура культуральная инактивированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК».

Определение авирулентности и безвредности вакцин. Контроль авирулентности противоящурных вакцин осуществляли согласно СТО 00495527-0065-2012 «Вакцина против ящура культуральная инактивированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК».

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка заключалась в определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,005$.

2.3 Результаты исследований

Адаптация изолятов вируса ящура О/МОГ/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018, А/ЕGY/2/2018 вируса ящура к монослойным культурам клеток СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ВНК-21. Для изучения в качестве кандидатов для

изготовления вакцин были выбраны три изолята: O/MOG/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018 и A/EGY/2/2018. Изучение первичной структуры участка генома методом нуклеотидного секвенирования показало, что изолят O/MOG/13/2017 вируса ящура принадлежит к генетической линии O/ME-SA/Ind-2001, Азия-1/Пакистан/2018 относится к генетической линии Азия-1/ASIA/Sindh-08, изолят A/EGY/2/2018 имеет родословную A/AFRICA/G-IV.

Адаптацию изолятов к монослойным культурам клеток СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ВНК-21 проводили в течение 6^{ти} последовательных пассажей. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты адаптации вируса ящура изолятов O/MOG/13/2017, Азия-1/Пакистан/2018, A/EGY/2/2018 к монослойным культурам клеток СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ВНК-21 (n=6)

Изолят вируса ящура	Культура клеток	Время репродукции, ч	Концентрация 146S частиц в количественной ОТ-ПЦР-РВ, мкг/см ³	Титр инфекционной активности, lgТЦД ₅₀ /см ³
O/MOG/13/2017	СП	18-20	0,42-0,70	5,50-7,25
	IB-RS-2	17-21	0,52-1,06	5,25-7,00
	ПСГК-30	18-22	0,65-1,25	5,75-7,10
	ВНК-21	17-21	0,62-1,04	5,75-6,25
Азия-1/ Пакистан/2018	СП	18-20	0,40-0,85	5,60-6,35
	IB-RS-2	16-17	0,54-0,94	5,20-6,25
	ПСГК-30	15-17	0,50-0,68	6,35-7,00
	ВНК-21	16-20	0,62-1,02	5,75-6,50
A/EGY/2/2018	СП	17-22	0,35-0,80	5,36-6,10
	IB-RS-2	17-21	0,29-1,30	5,33-6,17
	ПСГК-30	15-22	0,96-2,37	5,42-6,00
	ВНК-21	16-20	0,58-1,48	5,50-6,08

По результатам исследований определили, что репродукция изолята O/MOG/13/2017 в монослойных клеточных линиях СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ВНК-21 проходила при специфическом разрушении клеток монослоя за 17-22 часа. В течение 6^{ти} последовательных пассажей отмечали увеличение значений титра инфекционной активности с 5,25 до 7,25 lgТЦД₅₀/см³ и накопление 146S компонента 0,42-1,25 мкг/см³. Накопление 146S компонента изолята вируса ящура Азия-1/ Пакистан/2018 в указанных культурах клеток достигало 0,40-1,02 мкг/см³, а титр инфекционной активности составил 5,20-7,00 lgТЦД₅₀/см³. Репродукция проходила при специфическом разрушении клеток монослоя за 16-20 часов. Изолят A/EGY/2/2018 успешно адаптировался в культурах клеток СП, IB-RS-2 и ПСГК-30, ВНК-21 в течение 6^{ти} пассажей с титрами инфекционной активности 5,33-6,17

$\lg\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и количеством 146S частиц $0,29-2,37 \text{ мкг}/\text{см}^3$. Репродукция вируса происходила за 15-22 часа инкубации.

Получение индикаторного (контрольного) вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV. На основании проведенной работы по изучению биологических свойств изолятов О/МОГ/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018 и А/EGY/2/2018 им были присвоены статусы штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18 и А №2205/G-IV.

Для получения индикаторного (контрольного) вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV КРС и овец заражали в слизистую языка, а свиней в венчики конечностей. Проводили три пассажа вируса ящура на животных, оценивали время появления генерализованной формы ящура, собирали вирусосодержащий материал и готовили 10% афтозную суспензию. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения титра инфекционной активности 10% афтозной суспензии вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV (n=3)

Штамм вируса ящура	Характеристика материала	Титр инфекционной активности вируса ящура		
		на подсвинке $\lg\text{ИД}_{50}/0,1\text{см}^3$ (n=1)	на КРС $\lg\text{ИД}_{50}/0,1\text{см}^3$ (n=1)	в культуре клеток СП, $\lg\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (n=3)
О №2344/ Монголия/2017	3п –10% афтозная суспензия на свиньях	4,00	-	6,00±0,18
	3п –10% афтозная суспензия на КРС	-	4,50	6,50±0,15
Азия-1 №2356/14/18	1п –10% афтозная суспензия на свиньях	5,50	-	5,83±0,22
	3п –10% афтозная суспензия на КРС	-	5,50	6,00±0,29
А №2205/G-IV	2п –10% афтозная суспензия на свиньях	5,0	-	5,92±0,22
	2п –10% афтозная суспензия на КРС	-	5,50	6,00±0,14

Весь полученный на КРС и свиньях вирусосодержащий материал был пригоден для исследования иммуногенной и протективной активности вакцин.

Адаптация вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV к суспензионной культуре клеток ВНК-21. Адаптацию штаммов вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV к суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 проводили в течение 6^{ти} последовательных пассажей. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Адаптация вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV к суспензионной культуре клеток ВНК-21
(n=3, M±m)

Название штамма	Время репродукции, ч	Концентрация 146S частиц в количественной ОТ-ПЦР-РВ, мкг/см ³	Титр инфекционной активности, lgТЦД ₅₀ /см ³
О №2344/Монголия/2017	19-22	2,12-2,25	6,20-7,50
Азия-1 №2356/14/18	17-21	1,38-1,61	6,50-7,00
А №2205/G-IV	17-21	1,40-1,84	6,42-6,92

По результатам проведенных исследований определили, что репродукция штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV вируса ящура проходила за 17-22 ч. В течение 6^{ти} последовательных пассажей значения титра инфекционной активности вируса незначительно колебались от 6,20±0,18 до 7,50±0,12 lgТЦД₅₀/см³. Концентрация 146S компонента с 1^{ого} по 6^{ой} пассажи изменялась с 1,38±0,01 до 2,25±0,04 мкг/см³.

Подготовка посевного вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV. При подготовке посевного вируса сравнивали количество 146S+75S компонентов в производственных расплодах при заражении суспензии клеток 6^{ым} пассажем (предпосевным вирусом) О №2344 Монголия/2017 и 3^{им} пассажем в монослойной культуре клеток ПСГК-30. По результатам исследования было установлено, что при использовании 6^{ого} пассажа репродукция вируса О №2344/ Монголия/2017 происходит за 19 часов с титром инфекционности 7,58±0,34 lgТЦД₅₀/см³ и 1,20±0,31 мкг/см³ 146S+ 75S компонента.

При использовании 3^{его} пассажа в качестве посевного материала была получена вирусодержащая суспензия с титром инфекционности 7,50±0,36 lgТЦД₅₀/см³ и 1,50±0,18 мкг/см³ 146+75S компонента. За 18 часов репродукция вируса была завершена.

В последующих экспериментах для получения производственных расплодов вируса ящура штаммов Азия-1 №2356/14/18 и А №2205/G-IV в суспензионной культуре клеток ВНК-21 использовали предпосевной вирус 3^{его} пассажа, репродуцированный в монослойной культуре клеток ПСГК-30. Результаты исследований показали, что накопление 146S иммуногенного компонента составляет 1,98±0,22 мкг/см³ для типа Азия-1 и 1,80±0,08 мкг/см³ для типа А, а инфекционная активность производственной расплодки в культуре клеток ВНК-21 была 7,50±0,15 lgТЦД₅₀/см³ и 7,70±0,18 lgТЦД₅₀/см³, соответственно.

Влияние режима инактивации и очистки на компонентный состав вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV. Инактивацию культурального вируса ящура, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21, проводили АЭЭИ в концентрации 0,03%

при температуре 37°C, pH 7,2-7,8 в течение 12 часов. Образцы инкубационной смеси отбирали через каждые 30 минут в течение 4 часов и устанавливали титр инфекционности в монослойной культуре клеток СП.

Результаты исследования кинетики инактивации вируса ящура штаммов О №2344 Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV показали, что титр инфекционности снизился до одной инфекционной единицы за 3 часа инкубации для типа О, за 3,5 ч для типа Азия-1 и за 4 часа для типа А. Расчетный уровень безопасности составил одну инфекционную единицу в объеме 10^{21} см³ культуральной суспензии для типа О, в объеме 10^{17} см³ культуральной суспензии для типа Азия-1 и в объеме 10^{16} см³ культуральной суспензии для типа А.

Исследовали влияние режима инактивации и очистки ПГМГ на сохранность 146+75S компонентов вируса ящура штаммов О №2344 Монголия/2017, Азия-1 №2356/2018 и А №2205/G-IV при постоянном режиме инактивации. Было установлено, что потери по общему вирусному белку составили 13,85-18,11%, а потери I46S+75S иммуногенных компонентов составили 5,35-18,30% в зависимости от типа вируса.

Концентрирование вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV методом ультрафильтрации. В результате концентрирования вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV методом ультрафильтрации были изготовлены концентраты для производства вакцин с различным содержанием иммуногенных компонентов: десятикратный концентрат вируса ящура штамма О №2344/Монголия/2017 ($12,1$ мкг/см³); двадцатикратный концентрат штамма Азия-1 №2356/14/18 ($22,2$ мкг/см³) десятикратный концентрат штамма А №2205/G-IV ($26,45$ мкг/см³). В данном исследовании также были изготовлены десятикратные концентраты из вируса ящура производственных штаммов типа О №2047/Саудовская Аравия/08 (О/МЕ-SA/PanAsia-2) ($13,0$ мкг/см³) и О №2147/Приморский/2012 (О/МЕ-SA/PanAsia) ($11,2$ мкг/см³).

Изготовление инактивированных противоящурных вакцин для ранней защиты. Определяли количество иммуногенных компонентов вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV в инактивированной суспензии в количественном варианте РСК. Было установлено, что наиболее близкими в антигеном отношении для штамма О №2344/Монголия/2017 является сыворотка против штамма О №2047/Саудовская Аравия/08, для штамма Азия-1 №2356/14/18 – сыворотка Азия-1 №1987/Амурский/2005 и для штамма А №2205/G-IV – А₂₂ №550/Азербайджан/64. Результаты исследования показали, что количество 146S+75S компонентов, определенных с гетерологичными сыворотками, составили: по типу О – $0,8$ мкг/см³, по типу Азия-1 – $1,69$ мкг/см³ и по типу А – $4,01$ мкг/см³.

Определение количества 146+75S компонентов, необходимых для формирования защиты в ранние сроки после вакцинации с использованием сорбированной вакцины для КРС. Приготовили сорбированные вакцины с сапонином из штаммов О №2047 Саудовская Аравия/08, Азия-1 №1985/Амурский/2005 и А₂₂ №550 Азербайджан/64. В прививном объеме 2 см³ содержалось: типа О – 6,4 мкг, типа Азия-1 – 13,59 мкг и А – 32,08 мкг. КРС вакцинировали подкожно: первую группу привили вакциной из штамма О №2047 Саудовская Аравия/08; вторую группу – вакциной из штамма Азия-1 №1985/Амурский/2005 и третью группу – вакциной из штамма А₂₂ №550 Азербайджан/64. Через 10 СПВ провели контрольное заражение: первую группу животных заразили вирусом О №2344/Монголия/2017, вторую группу – вирусом Азия-1 №2356/14/18 и третью группу – вирусом А №2205/G-IV в дозах 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³. Результаты контрольного заражения представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты контрольного заражения гетерологичными штаммами вируса ящура типов А, О, Азия-1 вакцинированного КРС

(n=3, M±m, p≤0,005)

Сорбированная вакцина из штамма	Прививная доза/количество мкг	Контрольный вирус на 10 СПВ	Титры ВНА, log ₂	Количество защищенных при контрольном заражении
О №2047 Саудовская Аравия/08	5,0/32	О №2344/ Монголия/2017	2,67±0,63	2/3
Азия-1 №1987Амурский/2005	3,0/40	Азия-1 №2356/14/18	3,17±0,76	3/3
А ₂₂ №550 Азербайджан/64	2,0/32	А №2205/G-IV	3,92±0,38	3/3
Контроль 1	-	О№2344/Монголия/2017	-	0/1
Контроль 2	-	Азия-1 №2356/14/18	-	0/1
Контроль 3	-	А №2205/G-IV	-	0/1

Примечание: числитель – количество защищенных животных при контрольном заражении; знаменатель – количество животных, использованных в опыте.

Результаты исследования показали, что вакцины, содержащие в прививной дозе не менее 32 мкг иммуногенных компонентов, защищают привитых животных через 10 суток после заражения гетерологичными штаммами вируса ящура.

Определение количества 146+75S компонентов, необходимых для формирования защиты в ранние сроки после вакцинации с использованием эмульсионной вакцины для свиней. Из полученных концентратов вируса ящура штаммов О №2344/Монголия/2017, О №2047/Саудовская Аравия/08, О №2147/Приморский/2012 изготовили моновалентные эмульсионные вакцины с применением адьюванта Montanide ISA-206 VG. По пять голов каждой вакциной иммунизировали подсвинков внутримышечно за ухом в две точки по 2 см³. Уровни гуморального иммунитета определяли в реакции нейтрализации через 4 и 7 дней после иммунизации. Контрольное заражение свиней провели через 7 дней после

введения вакцин адаптированным к свиньям вирусом О №2344/Монголия/2017. Результаты исследований отражены в таблице 5.

Таблица 5 – Исследование гуморального и протективного иммунитета у свиней, вакцинированных эмульсионными препаратами (M±m, p<0,001)

Характеристика вакцины/количество мкг 146+75S в дозе	Титры ВНА против вируса ящура, log ₂ (M±m)						Результаты заражения вирусом О №2344/Монголия/17 через 7 СПВ
	4 СПВ			7 СПВ			
	О №2047/Саудовская Аравия/08	О № 2147/Приморский/12	О №2344/Монголия/17	О №2047/Саудовская Аравия/08	О № 2147/Приморский/12	О №2344/Монголия/17	
Эмульсионная, О №2047/Саудовская Аравия/08/30,1 мкг	3,00±0,38	1,95±0,10	2,05±0,17	3,40±0,36	2,10±0,10	2,35±0,35	4/5
Эмульсионная, О №2147/Приморский/12/29,2 мкг	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
Эмульсионная, О №2344/Монголия/17/24,2 мкг	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							0/1

Примечание: числитель – количество защищенных животных при контрольном заражении; знаменатель – количество животных, использованных в опыте.

Результаты исследования показали, что после контрольного заражения через 7 СПВ были защищены все животные, привитые эмульсионными вакцинами из штаммов О №2344/Монголия/2017 и О №2147/Приморский/2012, а вакцина из штамма О №2047/Саудовская Аравия/08 защитила четырех животных из пяти. Контрольное животное заболело через 48 часов с генерализацией процесса. Уровень ВНА у привитых животных вакциной из штамма О №2047 Саудовская Аравия/08 составил через 4 СПВ – 2,05±0,17 log₂ и через 7 СПВ – 2,35±0,35 log₂ против гетерологичного штамма О №2344/Монголия/2017, что в 1,93 раза ниже на 4 СПВ и в 2,1 раз ниже на 7 СПВ, чем против гомологичного штамма.

Вакцина из штамма О №2147/Приморский/2012 индуцировала титры ВНА против штамма О №2344 Монголия/2017 в количестве 3,25±0,18 log₂ и 3,60±0,27 log₂ через 4 и 7 СПВ, соответственно, что в 1,10 и 1,50 раз ниже, чем против гомологичного штамма.

Четыре группы по шесть голов КРС были иммунизированы внутримышечно в среднюю треть шеи вакциной из штамма О №2344/Монголия/2017 в дозах 2 и 4 см³, а вакцинами из штаммов О №2147/Приморский/2012 и О №2047/Саудовская Аравия/08 в дозе 4 см³. Гуморальный и протективный иммунитет против гомологичных и гетерологичных штаммов изучали через 4 и 7 СПВ. Результаты исследований отражены в таблице 6.

Таблица 6 – Исследование гуморального и протективного иммунитета у КРС, привитого моновалентными эмульсионными вакцинами ($M \pm m, p \leq 0,001$)

Характеристика вакцины/ количество мкг 146+75S в дозе	Титры антител против вируса ящура, $\log_2 (M \pm m)$						Результаты заражения штаммом О №2344/Монголия/17 через 7 СПВ
	4 СПВ			7 СПВ			
	О №2047/ Саудовская Аравия/08	О №2147/ Приморский/12	О №2344/ Монголия/17	О №2047/ Саудовская Аравия/08	О №2147/ Приморский/12	О №2344/ Монголия/17	
Эмульсионная, О №2344/Монголия/17/12,1 мкг	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
Эмульсионная, О №2344/Монголия/17/24,2 мкг	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
Эмульсионная, О №2047/Саудовская Аравия/08/30,1 мкг	2,42± 0,14	1,88± 0,15	2,00± 0,22	4,92± 0,15	3,33± 0,19	2,83± 0,12	5/6
Эмульсионная, О №2147/Приморский/12/29,2 мкг	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							0/1
Контроль 2							0/1

Примечание: числитель – количество КРС, защищенных после контрольного заражения; знаменатель – количество КРС, зараженных контрольным вирусом.

Исследования против гомологичного вируса показали, что при введении одной дозы 2 см^3 (12,1 мкг 146+75S) компонентов вакцины из штамма О №2344/Монголия/2017, через 4 СПВ титры антител против гомологичного вируса составили $2,83 \pm 0,33 \log_2$, при инъекции 4 см^3 (24,2 мкг 146+75S) – $3,46 \pm 0,24 \log_2$. Увеличение прививной дозы в два раза увеличило прирост ВНА в 1,55 раза (на $0,63 \log_2$) на 4 СПВ и в 1,25 раза (на $0,54 \log_2$) на 7 СПВ по сравнению с однократной дозой. На 4 СПВ количество антител против гомологичного штамма превышало содержание ВНА против гетерологичных штаммов О №2047/Саудовская Аравия/08 и О №2147/Приморский/2012 в 2,37 и 2,0 раза и на 7 СПВ в 2,1 и 1,7 раза, соответственно.

Иммунизация КРС двойной дозой (30,1 мкг 146+75S) вакцины из штамма О №2047/Саудовская Аравия/08 также подтверждает увеличение титров антител в 5,7 раз в период с 4 по 7 СПВ против гомологичного штамма. Степень различия между титрами антител на 4 СПВ против гомологичного и гетерологичных штаммов О №2147 /Приморский/2012 и О №2344/Монголия/2017 составила 1,5 и 1,3 раза, соответственно, а на 7 СПВ – 3,0 и 4,3 раза.

При введении КРС вакцины из штамма О №2147/Приморский/2012 (29,2 мкг 146+75S) титры ВНА против гомологичного штамма с 4 по 7 сутки возросли в 3,7 раз. Количество антител против гетерологичных штаммов О №2047/Саудовская Аравия/08 и О №2344/Монголия/2017 снизилось в 1,4 раза на 4 СПВ и в 1,8 и 1,6 раз по сравнению с титрами ВНА против гомологичного штамма на 7 СПВ.

Результаты контрольного заражения штаммом О №2344/Монголия/2017 показали, что у всех шести животных, иммунизированных двойной дозой вакцин из штаммов О №2147/Приморский/2012 и О №2344/Монголия/2017, на 7 СПВ генерализации процесса заболевания не наблюдали. Вакцина из штамма О №2047/Саудовская Аравия/08 через 7 суток после введения не обеспечила защиту одной из шести голов КРС. Заболевшее животное на 7 СПВ имело титр ВНА, равный $2,75 \log_2$. У двух контрольных животных генерализация процесса обнаружена через 48 часов после заражения контрольным вирусом ящура.

В опытах на овцах испытали эмульсионную вакцину из штамма О №2344/Монголия/2017 на формирование иммунитета в ранние сроки после вакцинации. Животных вакцинировали двойной дозой (2 см³/12,1 мкг 146+75S компонентов) внутримышечно в две точки по 1 см³. Гуморальный иммунитет изучали через 4 СПВ против гомологичных и гетерологичных штаммов. В результате исследования на 4 СПВ у овец установили титры антител в пределе 2,94-3,75 \log_2 .

Иммуногенную активность вакцины из штамма Азия-1 №2356/14/18 с содержанием 22,2 мкг 146+75S компонентов в прививной дозе 2 см³ испытали количественным методом на КРС. По пять голов вакцинировали внутримышечно в верхнюю треть шеи в дозе 2 см³, 1/4 дозы и 1/16 дозы. Контрольное заражение проводили гомологичным вирусом через 4 СПВ.

Результаты исследований (таблица 7) показали, что вакцина, введенная КРС в цельном виде (2 см³), на 4 СПВ вызвала образование ВНА в количестве $3,50 \pm 0,37 \log_2$, в разведении 1/4 (0,5 см³) – $2,35 \pm 0,36 \log_2$, и в разведении 1/16 (0,12 см³) – $2,40 \pm 0,17 \log_2$ против гомологичного штамма.

Титры ВНА против гетерологичных штаммов при введении вакцины в цельном виде на 4 СПВ были ниже в 2,83-4,40 раза. Активность вакцины в прививной дозе для КРС составила 8 PD₅₀ при контрольном заражении гомологичным вирусом через 4 СПВ.

Количественный контроль иммуногенной активности эмульсионной вакцины из штамма Азия-1 № 2356/14/2018 провели на свиньях. Вакцину вводили внутримышечно за ухом в дозах 2 см³, 0,4 см³, 0,08 см³. Контрольное заражение свиней проводили через 4 СПВ введением под слизистую языка 10^4 ИД₅₀/0,2 см³ адаптированного к свиньям вируса Азия-1 № 2356/14/2018. Результаты исследований отражены в таблице 8.

Таблица 7 – Исследование иммуногенной активности противоящурной эмульсионной вакцины из штамма Азия-1 № 2356/14/2018 на КРС ($M \pm m$, $p < 0,001$)

Характеристика вакцины	Прививная доза ($\text{см}^3/\text{мкг}$)	Титры ВНА через 4 СПВ против вируса, \log_2						Результаты контрольного заражения вирусом Азия-1 № 2356/14/2018
		Азия-1 № 2356/14/2018	Азия-1 № 2309 Пакистан/2009	Азия-1 № 1946/Шамир 3/89	Азия-1 № 2145 /Таджикистан/2011	Азия-1 № 1730/Иран 58/99	Азия-1 № 1987/Амурский/2005	
Эмульсионная, Азия-1 № 2356/14/2018 на ISA-206	2,0/22,2	3,50±0,37	1,70±0,10	1,35±0,13	1,80±0,10	1,45±0,10	2,00±0,22	5/5
	0,5/5,50	2,35±0,36	Не исследовали					3/5
	0,12/1,39	2,40±0,17	Не исследовали					2/5
Контроль								0/2

Примечание: числитель – количество защищенных животных; знаменатель – количество зараженных животных

По результатам исследований было установлено, что у свиней, иммунизированных вакциной в цельном виде (2 см^3), титры антител на 4 СПВ были равны $3,85 \pm 0,23 \log_2$, в разведении 1/5 ($0,4 \text{ см}^3$) – $3,35 \pm 0,13 \log_2$ и в разведении 1/25 ($0,08 \text{ см}^3$) – $2,90 \pm 0,13 \log_2$ против гомологичного штамма. Титры ВНА против гетерологичных штаммов при введении вакцины в цельном виде были ниже в 2,46–4,76 раз.

Таблица 8 – Иммуногенная активность противоящурной эмульсионной вакцины из штамма Азия-1 № 2356/14/2018 на свиньях ($M \pm m$, $p < 0,001$)

Характеристика вакцины	Прививная доза ($\text{см}^3/\text{мкг}$)	Титры ВНА через 4 СПВ против вируса, $\log_2 (M \pm m)$						Результаты контрольного заражения вирусом Азия-1 № 2356/14/2018
		Азия-1 № 2356/14/2018	Азия-1 № 2109 Пакистан/2009	Азия-1 № 1946/Шамир 3/89	Азия-1 № 2145 /Таджикистан/2011	Азия-1 № 1730/Иран/58/99	Азия-1 № 1987/Амурский/2005	
Эмульсионная, Азия-1 № 2356/14/2018 на ISA-206	2,0/22,2	3,85±0,23	2,55±0,23	2,10±0,32	2,25±0,22	1,75±0,11	2,05±0,18	5/5
	0,4/4,44	3,35±0,13	Не исследовали					5/5
	0,08/0,89	2,90±0,13	Не исследовали					5/5
Контроль								0/2

Примечание: числитель – количество защищенных животных; знаменатель – количество зараженных животных

После контрольного заражения при патологоанатомическом осмотре не обнаружили генерализации процесса у всех вакцинированных животных.

Контрольные два подсвинка заболели ящуром через 48-72 часа после заражения. Активность вакцины в прививной дозе 2 см³ составила 55 PD₅₀.

Иммуногенную активность эмульсионной вакцины из штамма А №2205/G-IV с содержанием 26,45 мкг 146+75S компонентов в прививной дозе 2 см³ испытывали количественным методом на КРС. По пять голов вакцинировали внутримышечно в среднюю треть шеи в дозе 2 см³, 1/4 дозы и 1/16 дозы. Контрольное заражение проводили через 4 СПВ путем введения 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³ гомологичного вируса. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Иммуногенная активность противоящурной эмульсионной вакцины из штамма А №2205/G-IV на КРС через 4 СПВ (M±m, p<0,001)

Характеристика вакцины	Прививная доза (см ³ /мкг)	Титры ВНА через 4 СПВ против вируса, log ₂							Результаты контрольного заражения вирусом А №2205/G-IV
		А №2205/G-IV	А №2248/Египет/18/2012	А №2029/Турция/06	А №550/Азербайджан/64	А ₂₂ Ирак 24/64	А №2269/ВНИИЗЖ / 2015	А №2155/Забайкальский/2013	
Эмульсионная, А №2205/G-IV на ISA-206	2,0/26,45	3,45±0,44	1,45±0,15	1,35±0,17	2,00±0,11	2,00±0,18	1,15±0,15	1,10±0,10	5/5
	0,50/6,61	2,85±0,13	Не исследовали						5/5
	0,12/1,65	2,50±0,41	Не исследовали						3/5
Контроль									0/2

Примечание: числитель – количество защищенных животных; знаменатель – количество зараженных животных

По результатам исследования было установлено, что у КРС, иммунизированных вакциной в цельном виде (2 см³), титры антител на 4 СПВ составили 3,45±0,44 log₂, привитых вакциной в разведении 1/4 (0,5 см³) – 2,85±0,13 log₂ и в разведении 1/16 (0,12 см³) – 2,50±0,41 log₂ против гомологичного штамма. Титры ВНА против гетерологичных штаммов при введении вакцины в цельном виде были ниже в 1,72-3,10 раз. Иммуногенная активность эмульсионной вакцины для КРС составила 18,18 PD₅₀ в дозе 2 см³.

Иммуногенную активность эмульсионной вакцины из штамма А №2205/G-IV испытывали на свиньях. Вакцину вводили внутримышечно: без разведения в дозе 2 см³ пяти животным, пяти – в разведении 1/5 и пяти – в разведении 1/25. Контрольное заражение проводили через 4 СПВ путем введения гомологичного вируса под слизистую языка в дозе 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³.

По результатам исследований (таблица 10). было установлено, что противоящурная вакцина из штамма А №2205/G-IV в цельном виде (2 см³) индуцировала у свиней выработку ВНА в титре 3,10±0,19 log₂, введенная в разведении 1/5 (0,4 см³) – 2,50±0,24 log₂ и в разведении 1/25 (0,08 см³) – 2,50±0,24 log₂ на 4 СПВ против гомологичного штамма. Титры антител при введении вакцины

в цельном виде против гетерологичных штаммов были ниже в 1,29-2,6 раз. Иммуногенная активность эмульсионной вакцины для свиней составила 22,22 PD₅₀ в дозе 2 см³.

Таблица 10 – Иммуногенная активность противоящурной эмульсионной вакцины из штамма А №2205/G-IV на свиньях (M±m, p<0,001)

Характеристика вакцины	Прививная доза (см ³ /м кг)	Титры ВНА через 4 СПВ против вируса, log ₂							Результаты контрольного заражения вирусом А №2205/G-IV
		А №2205 / G-IV	А №550/ Азербайджан/ 64	А ₂₂ Ирак 24/64	А №2248/ Египет/ 18/ 2012	А №2029 / Турция /06	А №2269 / ВНИИ ЗЖ/ 2015	А №2155/ Забайкальский/20 13	
Эмульсионная, А №2205/G-IV на ISA-206	2,0/ 26,45	3,10± 0,19	2,40± 0,20	2,30± 0,10	1,50± 0,18	1,75± 0,11	1,20± 0,17	1,60± 0,10	5/5
	0,4/ 5,29	2,50± 0,24	Не исследовали						4/5
	0,08/ 1,06	2,00± 0,14	Не исследовали						3/5
Контроль									0/2

Примечание: числитель – количество защищенных животных; знаменатель – количество зараженных животных

Исследование сывороток крови животных на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура после вакцинации эмерджентными вакцинами. Результаты исследования в блокирующем варианте ИФА сывороток крови КРС и свиней, привитых противоящурными вакцинами для ранней защиты из штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 № 2356/14/18 и А №2205/G-IV, не содержали антител к неструктурным белкам вируса ящура (значения процента ингибиции (PI) для сывороток крови КРС и свиней <50%). Эмульсионные вакцины были авирулентными и безвредными.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненных исследований (выводы):

1. Разработаны моновалентные эмульсионные вакцины против вируса ящура типов О, Азия-1, А для ранней защиты, которые являются авирулентными, безвредными, стерильными, иммуногенными и не индуцируют выработку антител к неструктурным белкам вируса ящура.

2. Адаптированы изоляты вируса ящура О/MOG/13/2017, Азия-1 Пакистан/2018, А/EGY/2/2018 к монослойным культурам клеток СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ВНК-21 и оптимизированы условия получения производственных расплодов для изготовления инактивированных вакцин путем использования 3^{его} пассажа в культуре клеток ПСГК-30 в качестве предпосевного вируса.

3. Адаптированы штаммы вируса ящура О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV к суспензионной клеточной линии ВНК-21 и

установлено, что репродукция вирусов происходит с проявлением специфической гибели клеток на 90-100% через 19-20 часов после инфицирования, наибольшее количество 146S компонента отмечается на этапе 5-6^{ого} пассажей.

4. Установлено, что отработанный режим инактивации вирусов 0,03% АЭЭИ, рН 7,2-7,8, температура 37°C и время инкубации 12 часов обеспечивал содержание одной инфекционной частицы в 10^{16} - 10^{21} см³ инаktivированной суспензии.

5. Определено, что моновалентная эмульсионная вакцина из штамма О №2344/Монголия/2017 с содержанием 12,1 мкг 146+75S компонентов в прививной дозе 2 см³ на 4 СПВ индуцировала титры ВНА против гомологичного штамма в 1,2 раза ниже по сравнению с применением двойной дозы, на 7 СПВ индуцировала титры ВНА в пределе $4,67 \pm 0,23 \log_2$ и обеспечила защиту КРС от заражения гомологичным вирусом.

6. Установлено, что моновалентная эмульсионная вакцина из штамма О №2047/Саудовская Аравия/08 с содержанием 30,1 мкг 146+75S компонентов в прививной дозе 2 см³ защитила 80% КРС и 80% свиней после контрольного заражения гетерологичным вирусом О №2344 Монголия/2017 на 7 СПВ.

7. Показано, что моновалентная эмульсионная вакцина из штамма О №2147 Приморский/2012 с содержанием 29,3 мкг иммуногенных компонентов в прививной дозе 4 см³ защитила КРС и свиней через 7 СПВ от заражения гетерологичным вирусом О №2344/Монголия/2017.

8. Определено, что противоящурная инаktivированная эмульсионная вакцина из штамма Азия-1 №2356/14/18, содержащая в прививном объеме 2 см³ 22,2 мкг иммуногенных компонентов, обладала иммуногенной активностью 8 PD₅₀ для КРС и 55 PD₅₀ для свиней через 4 суток после иммунизации при контрольном заражении гомологичным вирусом.

9. Установлено, что иммуногенная активность эмульсионной вакцины из штамма А №2205/G-IV, содержащей в прививном объеме 2 см³ 26,45 мкг 146+75S компонентов, была 18,18 PD₅₀ для КРС и 22,22 PD₅₀ для свиней через 4 суток после иммунизации при контрольном заражении гомологичным вирусом.

Практические предложения. На основании проведенных исследований были разработаны, рассмотрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «Методические рекомендации по определению титра инфекционной активности культурального вируса ящура в сырье для вакцины методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)»; СТО 00495527-0065-2020 «Вакцина против ящура культуральная инаktivированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК»; СТО 00495527-0143-2018 «Вакцина против ящура сорбированная моно-и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

Перспектива дальнейшей разработки темы. Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку и изготовление поливалентных эмульсионных вакцин для ранней защиты из актуальных штаммов О №2344/Монголия/2017, Азия-1 №2356/14/18, А №2205/G-IV для практического применения.

4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение иммуногенной активности инактивированной сорбированной вакцины против ящура из штамма А/ВНИИЗЖ/2015 (А/ASIA/G-VII) / **Ю.С. Елькина**, Д.В. Михалишин, Д.А. Лозовой [и др.] // Достижения молодых ученых – в вет. практику: материалы 5-й Междунар. науч. конф. – Владимир, 2019. – С. 7-14.

2. Изучение иммуногенной активности эмульсионной противоящурной вакцины из штамма А/ВНИИЗЖ/2015 (А/ASIA/G-VII) / **Ю.С. Елькина**, Д.В. Михалишин, В.А. Стариков [и др.] // Ветеринария. – 2020. – № 11. – С. 19-24.

3. Изучение формирования раннего иммунитета у естественно восприимчивых животных против ящура типа О / Д.В. Михалишин, Д.А. Лозовой, В.А. Стариков, **Ю.С. Елькина** [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2020. – № 2 (33). – С. 94-101.

4. Иммуногенные и протективные свойства противоящурной эмульсионной вакцины из штамма О/Забайкальский/2016 / **Ю.С. Елькина**, Д.В. Михалишин, В.А. Стариков [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 1. – С. 31-32.

5. Иммуногенные и протективные свойства противоящурной эмульсионной вакцины для ранней защиты из штамма Азия-1/Пакистан/2018 / **Ю.С. Елькина**, Д.В. Михалишин, В.А. Стариков [и др.] // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ивана Васильевича Звягина. Москва, 2020. – С. 56-60.

6. Патент № 2741639 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/135, С12N 7/00, С12R 1/93. Вакцина для ранней защиты против ящура типа Азия-1 инактивированная эмульсионная: № 2020119505 : заявл. 05.06.2020 : опубл. 28.01.2021 / В.А. Стариков, Д.В. Михалишин, Д.А. Лозовой, М.И. Доронин, А.В. Борисов, **Ю.С. Елькина** [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ").

Подписано в печать 14.02.2022 г.

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 1

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»