

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

На правах рукописи

ГОЧМУРАДОВ Ыхлас Мурадович

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИММУНОГЕННОЙ
АКТИВНОСТИ ПРОТИВОЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЫ**

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук
Михалишин Д.В.

Владимир - 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Характеристика вируса ящура	12
1.2 Способы культивирования вируса для приготовления вакцин.....	14
1.2.1 Производственная среда.....	14
1.2.2.Посевной вирус.	15
1.2.3.Инактивация вируса при изготовлении вакцин.....	16
1.2.4Очистка и концентрирование вируса ящура.....	19
1.3.Использование адъювантов при изготовлении противоящурных вакцин	21
1.3.1 Адъюванты серии Montanide для получения детекторных антител к вирусу ящура	23
1.4 Методы контроля иммуногенности и протективности противоящурных вакцин	24
1.4.1. Методы косвенной оценки активности противоящурных вакцин	34
1.4.2. Противовирусный поствакцинальный иммунитет	41
1.6 Иммуноферментный анализ в диагностике ящура	43
1.6.1 История разработки ИФА для диагностики ящура	43
1.6.2 Различные форматы ИФА для диагностики ящура	44
1.7 Заключение по литературному обзору.....	47
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
Материалы.	50
Методы.	54

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	61
3.1 Разработка тест-систем на основе антигена вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014».	61
3.2 Усовершенствование тест-системы ЖБ ИФА при определения вируснейтрализующих антител после вакцинации.	67
3.2.1 Получение антигена вируса ящура.....	67
3.2.2 Определение активности антигена, сенсibiliзирующих и детекторных антител к вирусу ящура штамма «О №2212/ Приморский/2014» генетические линии О/SEA/Mya-98 и штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97.	71
3.3 Валидационные характеристики разработанных тест-систем.....	82
3.4 Результаты исследований гуморального иммунитета у вакцинированных эмульсионными вакцинами животных методом ЖБ ИФА и в реакции нейтрализации.	86
3.5. Изучение гуморального и протективного иммунитета у свиней, вакцинированных производственной серией вакцины.	97
3.6 Определение антител к неструктурным белкам вируса ящура у вакцинированных свиней.	104
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь парнокопытных животных, способная вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб сельскому хозяйству различных стран. Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия 1, SAT 1, SAT 2 и SAT 3 [87].

Для стран, свободных от ящура, сохраняется опасность заноса болезни из неблагополучных регионов. Так, государства Азии и Ближнего Востока активно развивают индустрию туризма и имеют торгово-экономические связи с Россией, вследствие этого всегда существует риск заноса заболевания на территорию РФ [76]. Кроме того, ящур создает существенные барьеры для международной торговли животными и продуктами животноводства [52,160].

Вакцинация является основным методом борьбы с ящуром. Поскольку возбудитель этого заболевания является РНК-содержащим вирусом, он имеет очень высокую частоту мутаций из-за отсутствия механизма репарации вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Исходя из этого, происходит его быстрая эволюция, приводящая к постоянно возникающим новым генетическим и антигенным вариантам вируса, которые могут преодолевать иммунитет вакцинированных животных и вызывать вспышки. Это значительно осложняет борьбу с заболеванием и определяет необходимость постоянного мониторинга разнообразия вируса ящура в природе и современной разработки новых вакцинных препаратов, адаптированных к появляющимся генетическим линиям вируса [38,148].

В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных ВОЗЖ, [167] для определения иммунного статуса животных применяют реакцию нейтрализации (РН) и жидкофазный блокирующий вариант иммуноферментного анализа (ЖБ ИФА). РН считается чувствительным и

специфичным методом, однако проведение анализа имеет ряд следующих ограничений: 1) большая продолжительность времени постановки реакции (не менее 3 суток), 2) высокая стоимость процедуры, связанная с применением чувствительной клеточной линии и необходимостью применения CO₂-инкубатора, 3) предполагает использование неинактивированного вируса ящура, который является биологическим агентом II группы патогенности.

В свою очередь, ИФА обладают многими преимуществами, включая экспрессность, высокую специфичность и чувствительность, пригодность для крупномасштабного скрининга полевых образцов и отсутствие требований к специальным лабораторным условиям, например, культуре клеток или среде углекислого газа. Исходя из этого, для определения титра антител у вакцинированных животных целесообразно применять ИФА [153,96]

В современной диагностике ящура особое место занимает ЖБ ИФА, который ВОЗЖ рекомендует как один из основных методов контроля иммуногенности вакцин. Суть метода заключается в том, что антитела из сыворотки крови вакцинированных животных конкурируют с детектирующими антителами за связывание с вирусным антигеном непосредственно в жидкой фазе. Такой подход имеет важное преимущество, а именно, он позволяет выявлять те антитела, которые специфичны к иммуногенным эпитопам вируса ящура. Благодаря этому результаты анализа хорошо коррелируют с результатами РН и реальной защитой животных от заболевания.

Применение гетерологичных штаммов и компонентов, полученных на их основе в тест-системе ИФА, часто приводит к занижению значений титра антител в сыворотках крови животных, что может негативно сказаться на объективной оценке качества вакцины.

В последние годы активно циркулирующие изоляты и штаммы вируса ящура генотипа O/SEA/Mya-98 имеют существенные отличия от других линий серотипа O, что подтверждается анализом нуклеотидной и аминокислотной последовательности

высоко вариабельного пептида вируса ящура VP₁. Для изолятов вируса ящура серотипа А также характерно генетическое разнообразие. Очень распространенным в странах Азии является генотип A/ASIA/Sea-97. При этом ранее созданные тест-системы на основе ИФА по результатам исследований оказались менее чувствительными и специфичными по отношению к вирусу ящура генотипов O/SEA/Mya-98 (штамм «О №2212/Приморский/2014») и A/ASIA/Sea-97 (штамм «А №2155/Забайкальский/2013»), выявляя антитела к указанным штаммам не более, чем на 50% [19].

В связи с этим возникает необходимость разработки тест-систем на основе ЖБ ИФА с использованием антигенов актуальных штаммов вируса ящура, что позволит обеспечить точную диагностику заболевания и сопровождать вакцину для получения достоверных результатов контроля ее иммуногенности.

Степень разработанности темы. Традиционно иммуногенную активность таких препаратов оценивали путем определения титра вируснейтрализующих антител в сыворотках вакцинированных животных, что требовало использования культур клеток и работы с живым вирусом [14, 87].

Начиная с 80-х годов XX века, активно разрабатывался метод иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу ящура. Зарубежные исследователи Hamblin С. с соавторами (1986) [153] предложили блокирующий вариант ИФА (LP-ELISA) для выявления антител к вирусу ящура и показали его преимущества в сравнении с реакцией нейтрализации. Позднее Kitching R.P. (1988) [158] продемонстрировал возможность использования ИФА для подбора оптимальных вакцинных штаммов вируса ящура. Robiolo B. с соавторами (2006) [189], предложили методику оценки потенции противоящурных вакцин с помощью ИФА в жидкой фазе как альтернатива контрольному заражению.

В последние годы, согласно руководству ФАО и ВОЗЖ (Самиа Метвалли и др., 2019; Феррари Д. и др., 2019) [58,72] значительное внимание уделяется

поствакцинальному мониторингу и стандартизации методов оценки эффективности вакцинации против ящура. Tamil Selvan R.P. и соавторы (2016) изучали взаимосвязь между титрами нейтрализующих антител и результатами блокирующего ИФА[100].

Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, проведенный российскими учеными [73,75,82].

Захаров В.М. в составе международной группы исследователей (Paton D.Y. Valacher Y.F. и др., 2005) проводили работы по изучению принципов селекции вакцинных штаммов вируса ящура, что имеет прямое отношение к оценке эффективности вакцин[190]. Михалишин Д.В. [38] в своей работе по разработке технологии изготовления эмульсионной вакцины против ящура также затрагивал вопросы контроля иммуногенности препарата.

В России исследования по усовершенствованию методов контроля иммунного ответа на противоящурные вакцины проводились в ФГБУ «ВНИИЗЖ». Дудникова Е.К. (1997) разработала и внедрила иммуноферментный анализ на основе жидкофазного блокирующего варианта для выявления противоящурных антител в сыворотке крови животных [17].

Значительный вклад в развитие методов контроля иммунного ответа к вирусу ящура внесли работы специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: Кременчугская С.Р., Луговская Н.Н. и др. (2017) изучили особенности гуморального иммунитета у животных [18], также провели валидацию методики определения уровня противоящурных антител. Камалова Н.Е. (2010) разработала методы экспресс-диагностики для идентификации и серологического мониторинга по ящuru [28].

Цель и задачи научных исследований. Основной целью наших исследований было усовершенствование тест-систем на основе жидкофазного блокирующего варианта ИФА для выявления антител к структурным белкам вируса ящура и контроля качества вакцин против ящура.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. определить влияние методов очистки и инаktivации на сохранность 146S частиц вируссодержащей суспензии;
2. разработать схему подготовки антигенов вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014» для получения детекторных и сенсibilизирующих антител;
3. оптимизировать схемы и методы изготовления иммуноспецифических компонентов тест-системы на основе ЖБ ИФА и произвести выбор рабочих концентраций антигена, детекторных и сенсibilизирующих антител;
4. разработать тест-системы из актуальных штаммов для определения уровня антител к вирусу ящура в сыворотках крови вакцинированных животных и оценки иммуногенности вакцин против ящура;
5. провести валидацию разработанных тест-систем на основе ЖБ ИФА;
6. провести сравнительную оценку чувствительности и специфичности разработанных тест-систем в сопоставлении с коммерческими аналогами и реакцией нейтрализации;
7. исследовать сыворотки крови в реакции нейтрализации и ЖБ ИФА от животных, вакцинированных различными способами с результатами контрольного заражения.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований:

- разработаны тест-системы на основе ЖБ ИФА для оценки иммуногенности вакцины против ящура;
- оптимизированы схемы и методы получения иммуноспецифических компонентов тест-систем на основе ЖБ ИФА и произведен выбор концентраций антигена, детекторных и сенсibilизирующих антител;

- изучен гуморальный иммунитет с применением разработанных тест-систем ЖБ ИФА у вакцинированных животных после введения препаратов с различными адъювантами и способами введения;

- проведена сравнительная оценка уровней гуморального иммунитета в РН и с помощью разработанной тест-системы ЖБ ИФА с результатами контрольного заражения;

- определено влияние адъювантов на индукцию гуморального иммунитета у привитых животных с помощью ЖБ ИФА;

Научная новизна исследований подтверждена получением 5 патентов РФ:

- Патент № 2798510 С1 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, G01N 33/53. «Тест-система для количественного определения уровня гуморального иммунитета животных против антигена вируса ящура А N 2205/G-IV генотипа А/AFRICA/G-IV с помощью жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА»: № 2022122687 : опубл. 23.06.2023;

- Патент № 2787714 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/42. «Тест-система на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА для определения титра антител против вируса ящура штамма А N2269/ВНИИЗЖ/2015 генотипа А/ASIA/G-VII в сыворотках крови животных после иммунизации»: № 2022108324: опубл. 11.01.2023;

- Патент № 2796393 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, А61К 39/135. «Способ быстрого количественного определения уровня гуморального иммунитета животных к штамму О N2311/Забайкальский/2016 генотипа О/ME-SA/Ind-2001 вируса ящура после вакцинации с помощью жидкофазного "сэндвич"-варианта ИФА»: № 2022113420: опубл. 23.05.2023;

-Патент №2812211 «Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «Азия-1 №2356/14/2018» с помощью

жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА». Заяв.03.07.2023; опубл.25.01.2024 Бюл.№3;

-Патент № 2815540 «Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма "О N2212/Приморский/2014" генотипа О/SEA/Mya-98 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА» Заяв.11.05.2023; опубл.18.03.2023 Бюл.№8.

Теоретическая и практическая значимость работы. Усовершенствованы и внедрены в практику тест-системы ЖБ ИФА, которые позволяют эффективно за короткий промежуток времени оценить иммуногенность противоящурных вакцин, проводить мониторинговые исследования по оценке серологического статуса иммунизированных животных.

В результате проведенных исследований разработан ряд нормативных документов:

- СТО 00495527-0407-2022 «Набор для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе» (приложение 1).

- «Методические рекомендации по концентрированию антигена вируса ящура с помощью тангенциальной фильтрационной установки» (приложение 2);

- «Методические рекомендации по определению флокулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)» (приложение 3);

- «Промышленный регламент на производство набора для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе ПР-ЛПЯ-017/01» (приложение 4).

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

Основные положения выносимые на защиту.

- методология получения и стандартизация иммуногенного антигена для разработки диагностических тест систем;
- оптимизация аналитических параметров тест-систем на основе ЖБ ИФА и их валидация;
- сравнительный анализ гуморального иммунного ответа в зависимости от адъюванта и способа введения вакцин;
- верификация диагностической ценности ЖБ ИФА в сравнении с РН классическим методом оценки иммунитета;
- результаты сравнительной оценки гуморального иммунитета методами РН и ЖБ ИФА с результатами контрольного заражения.

Публикации. Основные результаты диссертационных исследований опубликованы в 10 научных работах, из них четыре – статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и пять патентов на изобретения РФ (№№2815540; 2798510; 2787714; 2796393; 2812211) (приложения 5 - 9).

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 148 страницах, содержит разделы: обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения, содержит 24 таблицы и 5 рисунков. Список использованной литературы включает 217 источников, из них 87 российских и 130 зарубежных. В приложениях представлены копии документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика вируса ящура

Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) вирусы подразделяются на группы, называемые таксонами, в том числе и вирус ящура, вирус ящура подразделяется на сфера Riboviria, царство Orthornavirae, тип Pisuviricota, класс Pisoniviricetes, отряд Picornavirales, семейство Picornaviridae, род Aphthovirus, вид Foot-and-mouth disease virus [156].

Вирус ящура является представителем рода Aphthovirus семейства Picornaviridae и имеет 7 различных серотипов: О, А, Азия-1, С и SAT-1, SAT-2, SAT-3 [6]. Геном кодирует 4 структурных белка VP1, VP2, VP3, VP4. Петля G-H белка VP1 была идентифицирована как основной антигенный сайт. РНК вируса ящура также несет в себе информацию о 8 неструктурных белках (Lpro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3Cpro и 3D-РНК-зависимая РНК-полимераза). Вирус ящура имеет очень высокую частоту мутаций из-за отсутствия механизма репарации вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Антигенные варианты вызваны различными аминокислотными мутациями, приводящими к трудностям в борьбе с ящуром [66].

Ящур представляет собой небольшой вирус без оболочки с икосаэдрическим капсидом псевдо T=3, состоящим из 60 копий каждого из четырех структурных белков. Капсид окружает геном одноцепочечной РНК длиной 8,4 тыс. оснований, который ковалентно связан на своем 5'-конце с небольшим вирусным белком 3В (или VPg) и полиаденилирован на своем 3'-конце. При проникновении вируса в клетку вирусный геном быстро транслируется в полипротеин, который и посттрансляционно расщепляется вирусными протеиназами на несколько частично расщепленных, вероятно функциональных, промежуточных продуктов и в конечном итоге на 12 зрелых белков [146].

Наиболее вариабельным из всех белков вируса ящура является VP1, поскольку на него приходится около 90% мутаций всех структурных генов. Самыми вариабельными областями являются участки 40-60, 130-160 и 190-213 а.о. Участок поверхностного белка VP1 в регионе 130-160 а.о. отличается высокой вариабельностью, поскольку участвует в процессе связывания с рецепторами клетки-хозяина. Изменчивость данного региона дает возможность вирусу ящура взаимодействовать с рецепторами клеток разных типов и облегчает переход от одного вида хозяина к другому. Серотипы вируса ящура в среднем на 86% имеют идентичные последовательности, хотя VP1 значительно более вариабелен. Нуклеотидные последовательности кодирующей области VP1 используются для генетической характеристики штаммов ящура из-за их значимости для прикрепления и проникновения вируса в клетку, защитного иммунитета и специфичности серотипа [94].

Проблема антигенной изменчивости вируса ящура серотипа А имеет не только академическое значение, но и практическое применение в программах вакцинации. Вирус ящура характеризуется значительной вариабельностью антигенов как внутри одного серотипа, так и между генетическими линиями, что может проявляться в разных временных интервалах и на территориях различных стран [32]. Антигенная изменчивость вируса связана с заменами аминокислот в антигенных эпитопах на поверхности капсидных белков, особенно в зоне С-Н петли белка VP1. Ген VP1 используется для генетической идентификации штаммов из-за его роли в прикреплении вируса, формировании иммунитета и специфичности штамма. Филогенетический анализ на основе гена VP1 широко применяется для изучения эволюционной динамики вируса и определения эпизоотических связей между генетическими линиями, а также для отслеживания происхождения и передвижения вызывающих вспышки штаммов [75]. Иммунная система животных часто не распознает вирусы ящура из-за появления новых антигенных вариантов [21].

Критические изменения антигенных свойств штаммов могут привести к ослаблению иммунитета, вызванного другими антигенами, что уменьшает эффективность программ вакцинации и увеличивает риск эпизоотий. Это подчеркивает необходимость разработки противоящурных вакцин с учетом антигенной изменчивости вируса [55].

Глобальная справочная лаборатория по ящуру (WRLFMD) при Институте Пирбрайт в Великобритании предоставляет членам Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) регулярные отчеты с рекомендациями по выбору вакцинных штаммов вируса ящура. Отчеты включают рекомендации по различным типам вируса, включая О и А Азия-1, которые представляют угрозу для регионального пула Евразии, включая Ближний Восток. Выбор рекомендуемых вакцинных штаммов вируса ящура осуществляется Европейской Комиссией по борьбе с ящуром на основе вероятности возникновения вспышек ящура в ближайшем будущем. Этот выбор основан не только на географическом распространении штаммов, но и на анализе антигенной схожести или различий между эпизоотическими изолятами и штаммами, используемыми вакцинами [4].

1.2 Способы культивирования вируса для приготовления вакцин

1.2.1 Производственная среда

Легкость распространения вируса ящура требует, чтобы все работы с живым вирусом проводились в изоляционном помещении и в режиме, предотвращающем выход вируса в окружающую среду. В соответствии с требованиями GMP, а также для обеспечения сдерживания вирусов, все этапы производственного процесса должны проводиться в закрытой системе, состоящей из сосудов из нержавеющей стали, соединенных между собой трубопроводами. Поскольку даже системы безопасности могут дать сбой, необходим строгий режим для всего персонала и поддержание «осведомленности» о рисках. В зонах «высокого уровня защиты» производственного

объекта следует проводить работы только с живым вирусом. Вся остальная работа, например, культивирование клеток и приготовление вакцин, должна выполняться в тех зонах учреждения, где может быть гарантировано исключение живого вируса. Инактивированный антиген, безопасность (т.е. отсутствие вируса ящура) которого еще не подтверждена, должен обрабатываться в отдельной части здания, также находящейся под изоляцией. Передвижение людей между помещениями учреждения, где может присутствовать живой вирус, и «чистыми» помещениями должно строго контролироваться. Следуя принципу чтобы «открытая» работа с живым вирусом на производстве велась в стерильных условиях, в закрытых боксах. В принципе, статус страны или зоны, «свободной от ящура без вакцинации», не должен быть совместим с наличием объектов по производству ящура, если их безопасность не гарантирована. Поэтому может быть целесообразным, чтобы в будущем такая международная организация, как ВОЗЖ, не только устанавливала подробные требования к обращению с живыми вирусами ящура, но и проводила проверки на соответствие требованиям [128].

1.2.2 Посевной вирус

Выбор исходных вакцинных вирусов должен быть основан на простоте их выращивания в клеточной культуре, количественном выходе вируса, стабильности и при пассажах и широком антигенном спектре [192].

Исходные вакцинные вирусы должны быть охарактеризованы и должна быть доказана их чистота и свободна от всех внешних возбудителей. Должна быть установлена гомология с оригинальными кандидатными изолятами и доказана их эффективность против циркулирующих штаммов [58].

Важнейшими противоэпизоотическим мероприятием при ящуре является вакцинация. Необходимость подбора производственного штамма для изготовления вакцина продиктована тем, что защита против ящура внутри одного серотипа может

быть недостаточной и от этого зависит эффективность вакцинации в полевых условиях [31].

Штаммовая дифференциация при ящуре характеризует антигенное родство между полевым изолятом определённого серотипа и вакцинным штаммом и определяет насколько полевой вирус и вакцинный штамм соответствуют друг другу. Если выявленные антигенные различия существенны, то необходимо замена производственного штамма подготовленными кандидатами [175,167].

Значения антигенного родства (r_1), полученные в жидкофазном варианте иммуноферментного анализа (ЖБ ИФА), обладали меньшей вариабельностью по сравнению с результатами РМН и РН этот метод оказался более приемлемым для выбора вакцинных штаммов типа А [111].

Существующие принципы и методики выбора штаммов описаны в наземном руководств ВОЗЖ [215] и в обзоре Paton et. al.[190]. Kitching R.P., et al [158] для изучения антигенного соответствия штаммов вируса ящуре предложили жидкофазный вариант иммуноферментного анализа.

Метод основан на использовании конкурентного двойного сэндвич варианта ИФА и предназначен для того, чтобы заменить традиционные типирование с помощью РСК и РН. Поскольку для получения результатов в РСК потребуется как минимум полтора месяца, а для постановки РН условия для работы с вирулентным антигенами [159].

1.2.3 Инаktivация вируса при изготовлении вакцин

Изготовление цельновирионных вакцин против ящуре представляет собой сложный и многоэтапный процесс. Одним из обязательных этапов в технологии производства вакцин является инаktivация вируса ящуре. Инаktivация – это потеря вирусом способности к репродукции и инфицированию восприимчивых животных при сохранении антигенных свойств [59].

Основное требование к инактиванту состоит в том, чтобы он, изменяя нуклеиновую кислоту вируса, существенно не нарушал свойства белка – носителя иммуногенности. При изготовлении противоящурных вакцин формальдегид был первым химическим агентом, использованным для инаktivации вируса, с его помощью получили авирулентный, пригодный для иммунизации крупного рогатого скота препарат [209].

Формальдегид как инактивант имеет ряд недостатков: узкие границы концентраций, инаktivирующих инфекционность вируса и снижающих иммуногенность вакцины; многокомпонентный характер кривой снижения инфекционности, который не позволяет определить конечную точку инаktivации для расчета уровня безопасности вакцины; продукты реакции формальдегида с балластными белками обладают аллергической активностью; вакцины плохо сохраняются при повышенной температуре. В качестве инаktivантов были испытаны гидроксиламин, метилглиоксаль, окись этилена, однако они не нашли широкого применения при изготовлении противоящурных вакцин [103,170,181].

Исследования F. Brown et al. открыли новый класс химических веществ (азиридины), которые превосходили формальдегид в скорости инаktivации и сохранении иммуногенных свойств вируса ящура [203].

Bahnemann H. G. [101,102] предложил использовать для инаktivации вируса ящура реакционную смесь, полученную в результате синтеза этиленимина из 2-бромэтиламина гидробромида. Этот препарат был назван бинарным этиленимином, который широко используется в технологии изготовления противоящурных вакцин.

Азиридины инаktivируют инфекционность вируса по реакции первого порядка без существенного снижения иммуногенности. Линейное снижение инфекционности дает возможность рассчитать уровень специфической безопасности вакцины [38,67,69,65,213].

Скорость взаимодействия инактиванта с активными группами белковой оболочки и нуклеиновой кислотой вирусов прямо пропорциональна концентрации реагирующих групп. Кроме концентрации инактиванта на скорость инаktivации оказывают влияние температура, время инкубации, рН среды и компоненты вируссодержащей суспензии. При изготовлении вакцины особое значение имеет не скорость инаktivации основной массы вирусной популяции, а способность химического вещества обеспечивать полную инаktivацию вируса [70]

При производстве противоящурной вакцины важным требованием к обеспечению безопасности продукта является полнота инаktivации вируса ящура. Безопасность вакцины может контролироваться более эффективно с помощью изучения кинетики инаktivации, которая позволяет определить теоретическое время инаktivации, а также порядок дезактивации вируса. Логарифмический график остаточной инфекционности в зависимости от времени реакции инаktivации должен быть линейным. Полученная таким образом прямая линия позволяет провести экстраполяцию до конечной точки периода инаktivации. Проверка процесса инаktivации является неотъемлемой частью гарантии качества вакцины. Аминоэтилэтиленмин (АЭЭИ) в исследованиях Н. А. Улупова и др. был определен наиболее подходящим инактивантом, который используется в процессе изготовления противоящурных вакцин в настоящее время в РФ [70].

Преимущества и перспективность использования АЭЭИ в производстве вакцин против ящура отмечали в своих работах многие авторы [68,63,85,21,24, 6,37]. Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует для инаktivации инфекционности вируса ящура в производстве вакцин применять бинарный этиленмин [139]. Механизм инаktivации вируса этиленимином и его олигомерами заключается в алкилировании нуклеиновой кислоты или белка с разрывом этиленового цикла [1,69].

1.2.4 Очистка и концентрирование вируса ящура

Для очистки суспензии вируса ящура используются различные методы, которые зависят от конкретных целей исследования или производства вакцин. Вот несколько общих методов:

1. Центрифугирование: это один из самых распространенных методов, который позволяет отделять вирусные частицы от других компонентов суспензии. Центрифугирование может быть дифференциальным (для грубой очистки) или ультрацентрифугированием (для более тонкой очистки).

2. Фильтрация: Этот метод используется для удаления крупных частиц или примесей. Он может быть особенно полезен на ранних этапах очистки.

3. Хроматография: Хроматографические методы, такие как аффинная хроматография или ионообменная хроматография, позволяют разделять вирусные частицы на основе их размера, заряда или специфических биологических свойств.

4. Ультрафильтрация: Этот метод используется для концентрирования вирусных частиц и удаления низкомолекулярных примесей.

5. Плотностный градиент центрифугирования: Этот метод включает использование среды, такой как сахароза или цезиевый хлорид, для создания градиента плотности, который помогает отделять вирусные частицы на основе их плотности.

6. Диализ: Диализ может использоваться для удаления нежелательных малых молекул или ионов из суспензии вируса.

7. Микрофлюидные технологии: это более современный подход, который может использоваться для очистки и анализа вирусных частиц на микроскопическом уровне.

Выбор конкретного метода или их комбинации зависит от характеристик вируса ящура, требуемой степени очистки и доступного оборудования. В лабораториях и производственных условиях часто применяется последовательное сочетание нескольких методов для достижения оптимального результата. При производстве

вакцин важную роль играет очистка вирусной суспензии. На протяжении длительного времени для этих целей применяли полигуанидин и его производные. В настоящее время на рынке предлагают полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-гидрохлорид) – катионный полиэлектролит, обладающий уникальным сочетанием физико-химических и биоцидных свойств, которые позволяют использовать его практически во всех сферах народного хозяйства [5,11,78,51,26,43,53,8]. Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид представляет собой водорастворимый хлорсодержащий полимер с молекулярной массой 10000 Да с формулой $[-NH-C=(NH \times HCl)-NH-(CH_2)_6-]_n$, в котором хлор находится в виде комплексной соли хлористого водорода с сильным основным азотом соединения. Препарат с эмпирической формулой $(C_7H_{16}N_3Cl)_n$, выпускаемый промышленностью под торговой маркой «Полисепт», представляет собой водорастворимый полимерный продукт, который благодаря качествам катионного электролита в сочетании с полимерностью, а также наличию полярной гуанидиновой и неполярной гексаметиленовой группировкам, придающим адгезивные и поверхностно-активные свойства, имеет широкий спектр применения в народном хозяйстве. ПГМГ-гидрохлорид обладает высокой бактерицидной и фунгицидной активностью. Растворы препарата в 0,05%-й концентрации вызывают гибель грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в течение 5–25 мин. Продукт является абсолютно безопасным для здоровья людей и животных и экологически безвредным для окружающей среды [8,185,162].

Физико-химические свойства ПГМГ-гидрохлорида: не имеет цвета и запаха (некоторые не очень качественные образцы продукта имеют запах аммиака), пожаробезопасен, взрывобезопасен, полностью растворим в воде, растворим в спирте, не теряет своих свойств при отрицательных температурах, не разлагается, сохраняет свои физико-химические и биоцидные свойства при нагревании до $120 \pm 5^\circ C$. Срок годности 20%-го водного раствора – не менее 5 лет, 100%-го концентрата – не менее

7 лет. Биоцидные свойства ПГМГ-гидрохлорида: относится к биоцидам широкого спектра антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (включая микобактерии туберкулеза, легионеллеза), вирусов (в том числе вирусов энтеральных и парентеральных гепатитов, иммунодефицита человека, полиомиелита, гриппа, герпеса и др.), грибов, в том числе плесневых, дрожжевых и дрожжеподобных, грибов рода *Candida*, дерматофитов. Форма выпуска: в виде кусков (гранул) с содержанием ПГМГ-гидрохлорида от 95–98% или в виде водного раствора с содержанием ПГМГ-гидрохлорида 20%. При необходимости можно получить водные растворы с содержанием действующего вещества до 50%. Получают ПГМГ-гидрохлорид путем взаимодействия гексаметилендиамина с гуанидингидрохлоридом. Отмечена флокулирующая способность полисепта. Его применяют в виде 9%-го раствора в количестве 1,5–2,0 мг сухого вещества на 1 л сточных вод [45].

1.3 Использование адъювантов при изготовлении противоящурных вакцин

Инактивированные антигены ящура слабоиммуногенны и требуют специальных адъювантов для повышения иммуногенности и увлечение длительности иммунитета [92]. Проведены исследования несколько видов адъювантов на предмет их потенциальных возможностей способствовать иммунному ответу на противоящурные вакцины [92].

По типу адъювантов вакцины подразделяются на водорастворимые и масляные. Существует два вида масляных вакцин: с одинарной эмульсией “вода в масле” (В/М) и двойной эмульсией “вода в масле в воде” (В/М/В).

Водорастворимыми вакцинами обычно прививают крупный рогатый скот, овец, коз, и буйвалов; при введении свиньям они неэффективны [50]. Масляные вакцины применяют для всех видов животных [72].

Большое значение в повышении иммуногенной активности противоящурных вакцин имеет сапонин, адъювантную активность которого впервые установили Галеа и др.. [149]. Однако приоритет введения сапонины в качестве адъюванта в противоящурную вакцину принадлежит Эспине. По данным автора, сапонин способствует снижению дозы вакцины, увеличивает продолжительность иммунитета у вакцинированных животных и удлиняет срок годности препарата [124].

В нашей стране при изготовлении противоящурной вакцины впервые использовал сапонин в качестве адъюванта Н.И. Николаенко [42]. Вакцина с использованием сапонины успешно прошла испытания на крупном рогатом скоте.

Сапонин как неспецифический стимулятор иммунитета при изготовлении противоящурной сорбированной вакцины в дальнейшем был испытан Е.В. Андреевым и др.. [42]. Авторы отмечали, что иммуногенная активность сорбированной вакцины из лапинизированного и культурального вируса А22 с сапонином более выраженная, и предохраняла от заражения ящуром 100% привитого крупного рогатого скота, в то время как вакцина без сапонины отличалась слабой иммуногенностью и предохраняла 71,5% вакцинированных животных. Противоящурная сорбированная вакцина: выпускается с использованием ГОА и сапонины. Комплекс двух адъювантов в вакцине позволяет наиболее рационально использовать её потенциал для обеспечения оптимального иммунного ответа. Эффективность вакцины с ГОА и сапонином подтвердили многие исследователи [24,63,86]. Однако противоящурные сорбированные вакцины имеют существенные недостатки: относительно небольшую продолжительность иммунитета, наличие аллергических реакций, повышенную реактогенность отдельных серий препарата из-за нестандартности сапонины и, как следствие, снижение продуктивности [151].

Кроме того, использование для иммунизации свиней сорбированных противоящурных вакцин в целом не дало удовлетворительных результатов. Одни

исследователи отмечали при этом различной степени успехи, в то время как другие в своих исследованиях показали, что сорбированные вакцины мало или совершенно не эффективны для свиней даже при двукратной прививке и в больших дозах [36]. Принимая во внимание непригодность сорбированных вакцин для иммунизации свиней, в дальнейшем определилось новое направление исследований по изысканию и испытанию других более эффективных адъювантов, кроме геля гидроокиси алюминия и сапонины. Наибольших успехов добились исследователи, используя в противоящурных вакцинах для свиней масляные адъюванты [33].

1.3.1 Адъюванты серии Montanide для получения детекторных антител к вирусу ящура

Исследования адъювантов серии Montanide для получения детекторных антител к вирусу ящура представляют важный этап в разработке тест-систем. В рамках создания интенсивного противоящурного иммунитета у лабораторных животных, использовали различные адъюванты, включая гликозиды (сапонин, теосапонин и другие), минеральные масла, а также полные и неполные адъюванты Фрейнда [9,62].

Адъюванты Фрейнда, представленные на основе минерального масла, обладают способностью создавать "депо" в организме, что способствует сохранению антигена в высокой концентрации на протяжении продолжительного времени, усиливая его иммуногенные свойства. Однако, адъюванты данного типа характеризуются высокой реактогенностью и могут вызывать реакции некроза и местное раздражение у животных [29].

Анализ исследований показал, что использование адъювантов Montanide ISA 50V, Montanide ISA 206 и Montanide Ims 1312 позволяет получать высокоактивные и специфичные гипериммунные сыворотки у морских свинок. При применении этих адъювантов отмечалось низкое проявление воспалительных реакций на место

введения эмульсий по сравнению с неполным адъювантом Фрейнда. Сыворотки, наиболее активные по отношению к вирусу ящура типа А и О, были получены при использовании адъюванта Montanide ISA 206 [27].

Полученные сыворотки морских свинок применялись в качестве детекторных антител в диагностических наборах для обнаружения антигена вируса ящура и при проведении серологического мониторинга. Итак, адъюванты Montanide ISA 50V, Montanide ISA 206 и Montanide Ims 1312 оказались менее реактогенными для морских свинок, чем адъювант Фрейнда, и позволили получить высокоактивные и специфичные гипериммунные сыворотки к вирусу ящура для использования в качестве детекторных антител в иммуноферментном анализе. Адъювант Montanide ISA 206 является наиболее эффективным в индуцировании иммунного ответа у морских свинок в исследованиях с инактивированными вирусами ящура типа А и О [173].

1.4 Методы контроля иммуногенности и протективности противоящурных вакцин

В настоящее время для специфической противоящурной защиты используют инактивированные сорбированные и эмульсионные моно - и поливалентные вакцины из культурального вируса, выращенного в суспензии перевиваемой линии клеток [49].

Противоящурные вакцины готовят с соблюдением всех технологических условий с проведением необходимых контролей как исходных компонентов, так и конечного препарата на соответствие установленным национальным и международным стандартам [139]. Последние обобщены в рекомендациях Европейской комиссии ФАО по борьбе с ящуром, Международной ассоциации биологической стандартизации и Европейской фармакопее [176].

Применение вакцин имеет важное значение в системе мер борьбы с ящуром, и оценка их эффективности охватывает три этапа: первый - проведение контроля биологических свойств и специфической активности вакцин в строго

контролируемых лабораторных условиях; второй - оценка профилактической эффективности и третий - изучение противоэпизоотической эффективности в полевых условиях [14].

Оценка эффективности противоящурных вакцин на первом этапе включает проверку безопасности (безвредность, авирулентность и стерильность) и специфической активности [14].

Основными показателями специфической эффективности вакцин являются антигенность, иммуногенность и протективность. Оценку этих показателей осуществляют на естественно-восприимчивых животных, которые дают наиболее объективную информацию о качестве вакцины, так как оценивают совместное действие всей совокупности защитных механизмов, осуществляемых в условиях целостного организма на тест - объекте, для которого предназначен препарат. Эти методы являются основными референтными методами контроля иммуногенности вакцин [113,155]. Методы оценки поствакцинального иммунитета и качества противоящурных вакцин подразделяются на прямые и косвенные, а также на качественные и количественные [155].

При прямой проверке определяют устойчивость естественно восприимчивых к ящуру животных, привитых проверяемой вакциной, к контрольному заражению. Последнее, как правило, осуществляют на 14 — 21-й день после вакцинации производственным штаммом вируса. Ряд исследователей считают, что контрольное заражение необходимо проводить через 21 день после иммунизации сорбированной вакциной и через 28 дней после инокуляции эмульсионным препаратом [117]

Методы контроля основаны на реакции вакцинированных животных и выражаются в их защите против контрольного заражения одним из трех способов: 1) путем контакта с больными животными; 2) путем втирания инфекционного материала и слизистую оболочку языка или 3) введения 10000 инфекционных доз вируса в слизистую оболочку языка или в кожу венчика.

Способ контакта между вакцинированными и больными ящуром животными приближается к естественной инфекции, но требует равнозначных и больших групп животных. Применяют этот способ только для качественной оценки вакцин или изучения некоторых вопросов развития иммунитета [139].

Для контроля иммуногенности ветеринарных препаратов на сельскохозяйственных животных в нашей стране и за рубежом ранее использовали главным образом следующие методы:

Метод испытания одной постоянной дозы вакцины.

Метод испытания постоянной дозы вакцины или как его иногда условно называют "качественный" предусматривает контрольное заражение естественно-восприимчивых животных, привитых одной, ранее принятой прививочной дозой (объемом) вакцины. По количеству защищенных от заболевания животных, при одновременном заболевании всех или определенной доли контрольных невакцинированных животных, дают заключение о пригодности препарата в соответствии с заложенными требованиями. Качественный метод контроля противоящурных вакцин впервые предложил Уильямс. Испытание вакцины по этому методу проводили на 3-х головах крупного рогатого скота, которым инъецировали подкожно в подгрудок рекомендуемую дозу препарата [161].

Вакцинированных и равное количество контрольных животных заражали через 15 дней путем интрадермолингвального введения $0,1 \text{ см}^3$ афтозной вирусной суспензии, содержащей 10000 ИД₅₀, через 15 дней после заражения учитывали результаты. Препарат признавали пригодным при отсутствии вторичных поражений на конечностях у вакцинированных животных. У всех контрольных животных должна наступить генерализация заболевания.

В нашей стране контроль иммуногенности противоящурных вакцин осуществляли на крупном рогатом скоте или лабораторных животных.

При этом определяли процент защищенных животных от генерализованной формы ящура. Для обеспечения гарантированной защиты 85 - 87% животных вакцина в испытываемой дозе должна защищать, как правило, всех привитых животных в опыте. Этот метод использовали также в научных исследованиях при оценке и испытании новых препаратов [20].

Необходимо отметить, что "качественный" метод контроля по содержанию является количественным, так как в опыт берут несколько животных, определенное количество которых должно быть защищено, т.е. иммуногенность вакцины выражают количеством или долей (процентом) защищенных животных. Но при испытании одной дозы вакцины препарат можно характеризовать только качественно, т.е. с точки зрения его пригодности или непригодности в соответствии с заложенными требованиями. Качественный метод предусматривал бы испытание одной дозы препарата на одном животном, но таких методов нет [57].

Критические замечания в адрес "качественного" метода:

- метод не всегда дает возможность отличить проценты эффектов в опытной и контрольной группе, т. е. доказать, что большее количество защищенных животных в опытной группе по сравнению с контрольной является результатом иммунизирующего действия препарата. Следовательно, в ряде случаев метод не дает доказательства эффективности вакцины.

- метод дает относительно приближенную информацию о степени иммуногенности вакцины. Так, при защите 5-ти из 6-ти животных при контрольном заражении, гарантированный процент защиты животных в совокупности составляет лишь 36%, следовательно, при таком методе контроля можно выпустить и малоактивный препарат;

- метод может быть использован для сравнения препаратов, значительно отличающихся по своей иммуногенности, т. е. при сравнении высокоиммуногенной и слабоиммуногенной вакцины. Однако его нельзя использовать при сравнении двух

активных препаратов;

- метод не дает возможности определить 50% иммунизирующую дозу (ИмД₅₀) и иммуногенную активность, поэтому не может быть использован для определения прививочной дозы (объема) в зависимости от активности испытуемой серии препарата [57].

Наиболее объективная оценка иммуногенной активности противоящурной вакцины получена при количественных методах контроля на естественно восприимчивых и лабораторных животных. В свою очередь, количественные методы контроля подразделяются на:

- 1) методы, позволяющие определить вакцины, предохраняющие 50 % вакцинированных животных (ИмД₅₀);
- 2) методы, основанные на определении индекса защиты;
- 3) определение степени защиты от генерализации на конечностях по Willems.

Метод титрования вакцины предусматривает контрольное заражение определенного количества естественно-восприимчивых животных, вакцинированных несколькими различными дозами препарата, взятыми в определенном логарифмическом разведении. Этот метод основан на принципе "доза-эффект", т.е. установлении связи между процентом защиты животных и дозой вакцины [12].

Метод определения иммуногенной активности противоящурных вакцин путем ее титрования впервые был предложен Гендерсоном и Галловеем в 1953г. Он был использован для сравнительной оценки двух вакцин, изготовленных по способам Вальдмана и Френкеля. Ввиду того, что прививочные объемы вакцины были большими (20 - 30 см³), различные дозы испытуемого препарата вводили животные без разбавителя [126].

По мере совершенствования технологии изготовления противоящурных вакцин прививочные объемы уменьшились. Но так как малые дозы вакцины трудно вводить

при испытании препарата, то их стали готовить с использованием разбавителей. Поэтому на основе оригинального метода контроля иммуногенности по Гендерсону и Галловею были разработаны его модификации. Так, Terre и др. [114,117] был предложен "Рв" метод. Для чего вакцину, прививочная доза которой составляла 1,6 см³, разводили иммунологически неактивным буфером (карбонатным или фосфатным) не содержащим адъювантов, с кратностью разведения 1:3 или 1:4. Величину ИмД₅₀ КРС авторы определяли методом Литчфилда-Уилкинсона, а активность вакцины выражали величиной «Рв», т.е. количеством ИмД₅₀ КРС в прививочном объеме препарата. На основе этого метода была изучена закономерность кривой "доза-эффект" для крупного рогатого скота при испытании вакцины, изготовленной из вируса типов О, А и С по методу Френкеля. По мнению Terre и др. наклон линии "доза-эффект" может отличаться в зависимости от вакцинного штамма вируса. По мнению других авторов для вакцин, изготовленных из вируса типов О, А, С по методу Френкеля, такого различия обнаружено не было. Стельман и др. [112] считали, что линия "доза-эффект» не зависит от типа вакцинного штамма и от технологии изготовления вакцины. Английские исследователи предложили метод титрования вакцины на крупном рогатом скоте (РД-метод), отличающийся тем, что разведения вакцины готовят на иммунологически активном буферном растворе, содержащем гидроксал и сапонин. Сравнительные исследования показали, что метод, основанный на использовании нейтрального буферного раствора, имеет большую чувствительность и точность по сравнению с методом, предусматривающим использование иммунологически активного разбавителя. Другие исследователи считают, что использование иммунологически активного буферного раствора препятствует стандартизации метода определения иммуногенной активности противоящурных вакцин. Работы ряда авторов показали, что продолжительность иммунитета, создаваемого вакциной, как и способность защиты против нового варианта вируса ящура, зависит от напряженности иммунитета,

т.е., чем меньше значение $ИмД_{50}$ испытуемой серии вакцины, тем более продолжительный будет формироваться иммунитет. Классическим методом оценки иммуногенной и протективной активности вакцины является контроль ее на крупном рогатом скоте. При этом критерием иммунитета служит отсутствие вторичных поражений на конечностях при интрадермолингвальном заражении. Минимальные требования к иммуногенной активности противоящурной вакцины составляют 3 $ИмД_{50}$ в прививном объеме для крупного рогатого скота [130,135,138,140,174].

Процент защиты зависит в первую очередь от активности вакцины и прямо пропорционален ей. Иммуногенную активность ($ИмД_{50}$) инаktivированной противоящурной вакцины по одному из статистических методов определяют:

1. По методу Рида и Менча [206];
2. По методу Кербера [168].
3. По методу Кербера - Ашмарина [87];
4. По методу Спирмана - Кербера [180];
5. По методу пробитов [180];
6. Литчфилда - Уилкинсона [163].

Для определения качества противоящурных вакцин используют:

1. Молодняк КРС не моложе 6 месячного возраста [168].
2. Крупный рогатый скот 18 - 21 месячного возраста [30,206];
3. Крупный рогатый скот массой 300 - 400 кг. [23];
4. Молодняк КРС, массой 250 - 300 кг. [64];
5. Крупный рогатый скот массой 350 - 500 кг. [104];
6. КРС 12 - 13 месячного возраста разного пола, массой 250 - 350 кг. [81];
7. КРС 18 - 24 месячного возраста [168];
8. КРС в возрасте 18 - 30 месяцев [183].

При контроле противоящурных вакцин типов А, О и С установлено, что I функция наклона линии «доза-эффект» была равна 2,22 с ошибкой 1,14 [28].

Несмотря на объективную и количественную характеристику вакцины при контроле на естественно восприимчивых к ящуру животных, этот метод контроля трудоемкий и дорогостоящий. Поэтому для количественного контроля иммуногенной активности противоящурных вакцин использовали лабораторных животных (морских свинок, взрослых мышей и новорожденных мышат) [87]. Исследования показали, что морских свинок массой около 500 г можно; использовать для оценки иммуногенной активности противоящурных вакцин [123,132,138,188,195]. Внутримышечное введение вакцины обеспечивало удовлетворительный иммунный ответ. Титр вируснейтрализующих антител возрастал прямо пропорционально в зависимости от испытываемой дозы вакцины, Достигал максимума через 10 дней после иммунизации животных и сохранялся течение 2 - 5 месяцев [27]. На основе этого метод, предложенный Румянцевым и др. [60] заключался в вакцинации группы морских свинок различными дозами вакцины, взятыми в определённом логарифмическом разведении. Через 15 дней всех вакцинированных и группу контрольных животных заражали афтозным вирусом, адаптированным к морским свинкам (5-7 пассаж), вели наблюдение в течение семи дней. Защищенными считали животных, у которых отсутствовали вторичные афты на конечностях, в которые не вводили вирус. По каждой группе учитывали количество защищенных животных и методом Литчфильда [163] определяли 50% иммунизирующую дозу вакцины для морских свинок (ИмД₅₀МС). По мнению авторов показатель ИмД₅₀МС несёт ценную информацию об активности противоящурных вакцин. Использование этого метода позволило показать, что характер иммунного ответа морских свинок при испытании различных доз вакцины приближается к таковому для крупного рогатого скота и имеет место положительная корреляция между величинами ИмД₅₀МС и ИмД₅₀КРС. Отмечено также, что для каждого вакцинного штамма вируса требуется определение своего параметра ИмД₅₀, - соответствующего определённой степени иммуногенности вакцины для крупного рогатого скота [213,9,115 ,60].

На основании многочисленных опытов французскими исследователями установлено, что моновалентные противоящурные вакцины, имеющие ИМД₅₀ для морских свинок меньше 0,4 см³ для типа О; 0,3 см³ — для типа С и 0,1 см³ — для типа А, в прививной дозе трехвалентного препарата при контроле на крупном рогатом скоте содержат минимум 3 ИМД₅₀ каждой валентности [115]. Однако, Terre и др. [129] считали, что для некоторых вакцинных штаммов имеется достоверное различие в характере иммунного ответа крупного рогатого скота и морских свинок, хотя и не отрицали наличия корреляции между показателями иммуногенной активности вакцины для этих биологических систем. Более того, Garland и др. [150] утверждали, что корреляция между величинами ИМД₅₀КРС и ИМД₅₀МС может и отсутствовать, что зависит от вида вакцинного штамма и технологии изготовления препарата.

У отечественных и зарубежных исследователей показана возможность использования для контроля иммуногенности противоящурных вакцин взрослых белых мышей массой 18-20 г. приблизительно двухмесячного возраста на основе определения 50% иммунизирующей дозы вакцины для белых мышей - ИМД₅₀М [15,22,44,118,135]. Метод заключался в подкожной иммунизации различными дозами вакцины в объеме 0,4 - 0,8 см³, взятых в разведении 1:2 (20 мышей на разведение). Через 21 день всех вакцинированных и 20 контрольных, невакцинированных мышей заражали адаптированным к мышам вирулентным вирусом ящура и фиксировали гибель мышей. Затем на основе полученных результатов вычисляли ИМД₅₀ для белых мышей методом Кербера. Устанавливают дозу вакцины, защищающей 50 % привитых мышей от смертельной ящурной инфекции [44]. Выявлена линейная зависимость между дозой вакцины и уровнем иммунитета у привитым мышам.

В связи с тем, что ящур, и в особенности при экспериментальной инфекции, протекает в две фазы с образованием первичных и вторичных афт, французскими

исследователями [164] предложен метод оценки вакцины по индексу защиты, представляющему собой отношение титра вируса производственного штамма на контрольных животных к титру вируса на вакцинированных животных. При этом титр вируса рассчитывают по образованию первичных афт на месте его введения. Индекс защиты, представляет собой число инфекционных единиц, введение которых в чувствительные ткани группе вакцинированных животных вызывает появление у 50 % из них первичных афт.

Общая закономерность иммунологического ответа организма на ящурный антиген заключается в том, что с повышением уровня иммунитета у животного оно может выдержать более высокую дозу вируса без развития первичных поражений.

Метод Лукама и Феида использовали для определения качества противоящурной вакцины в Колумбии для количественной оценки иммуногенной активности противоящурных вакцин разработан метод оценки их по индексу защиты на морских свинках (индекс С). При этом вирус производственного штамма, адаптированный к морским свинкам, титруют на группе контрольных и вакцинированных животных. Если индекс С на морских свинках равен или выше 1,5, то вакцина обеспечивает защиту 75 % привитых животных. Когда индекс С выше или равен 2,0, то такая вакцина при контроле на крупном рогатом скоте с вероятностью 95 % будет иметь индекс К выше или равным 1,2 [135]. Отмечена возможность контроля иммуногенной активности противоящурных вакцин по индексу защиты взрослых белых мышей при титрации адаптированных к ним штаммов. В странах Южной Америки применяется разновидность теста на эффективность - тест РGP (процентный показатель защиты против генерализованного заражения конечностей). Способом, рекомендованным изготовителем, группу из 16 голов КРС 18 — 24 месячного возраста, не вакцинировавшихся против ящура и свободных от антител к различным типам вируса ящура, иммунизируют прививной дозой препарата. Спустя 4 недели после вакцинации данных животных и контрольную группу из двух

невакцинированных животных контрольно заражают суспензией вируса ящура, являющегося вирулентным и соответствующего вирусному типу, использованному в проходящей проверке вакцине, путем инокуляции 10000 БИД₅₀ (50% бычьей инфекционной доза), интрадермолингвально, в две точки на слизистой оболочке языка. У контрольных животных должны развиваться поражения по крайней мере на трех конечностях; при рутинном применении в целях профилактики вакцина должна защищать не менее 12 животных из 16 вакцинированных [44].

1.4.1 Методы косвенной оценки активности противоящурных вакцин

Классическая оценка эффективности противоящурных вакцин основывается на прямом испытании устойчивости к контрольному заражению вакцинированного крупного рогатого скота. Ряд исследователей [81,87] считают, что крупный рогатый скот представляет референтную систему для контроля противоящурных вакцин. Недостатком указанного метода является использование большого количества крупного рогатого скота и необходимость работы с вирулентным вирусом. У крупного рогатого скота одной весовой категории и привитого одинаковой дозой, установлены широкие вариации индивидуальных противоящурных титров антител и соответственно напряженности иммунитета, т. е. устойчивости к контрольному заражению [47].

Подобные факты многие исследователи объясняют генетической гетерогенностью животных, различиями в породности, возрасте, вариабельности физиологического статуса, иммунологической реактивности, гетерогенному иммунобиологическому статусу, предшествующим условиям содержания и кормления, влиянием на организм подопытных животных вирусных мутагенов и этиологически гетерогенных иммунодефицитных состояний [81,87,108,199,214]. Исходя из вышеизложенного, были испытаны различные косвенные методы определения иммуногенной активности вакцин, базирующиеся на определении

уровня сывороточных антител к соответствующему возбудителю.

Для определения качества противоящурных вакцин чаще всего используют методы определения уровня вируснейтрализующих антител. Эти методы основаны на строго специфическом взаимодействии антител с вирусом (антигеном), что позволяет быстро обнаруживать антитела и определять их уровень [87].

При анализе уровня вирусоспецифических антител возникает такая же проблема гетерогенности вакцинируемых животных, однако большое количество животных позволяет нивелировать эти различия. Определение уровня антител можно повторить, что позволяет исключить полученные неточности. Определение уровня вирусоспецифических антител является альтернативой методу контроля вакцин с контрольным заражением с более высокой статистической достоверностью, чем другие системы, при условии, что установлена статистическая зависимость между защитой вакцинированных животных и уровнем антител.

Использование серологических методов позволяет снизить стоимость контроля и избежать необходимости работы с вирулентным вирусом.

Недостатком этих методов является то, что в них определяется только гуморальный иммунный ответ. В тоже время многие исследователи считают, что сывороточные вируснейтрализующие антитела являются главным фактором в защите против ящура [87,108].

Одним из основных методов используемых для определения уровня вирусоспецифических антител является реакция нейтрализации [50]. Некоторые авторы [105,108] называют реакцию нейтрализации золотым стандартом (справочным методом) для определения вирусоспецифических антител.

Качество противоящурной вакцины можно определить по уровню антител в сыворотке крови привитых животных, выявленных в реакции нейтрализации в культуре клеток, ИФА или в реакции защиты на мышах - сосунах - при условии, что статистическая оценка установила наличие удовлетворительной корреляции между

результатами, полученными в ходе данной проверки соответствующего вакцинного серотипа, и в тесте на эффективность на КРС [183].

В 1952 г. Скиннер и соавт, использовали мышат-сосунов для определения уровня нейтрализующих антител к вирусу ящура. Впоследствии, однако, другие исследователи, используя мышиную модель, описывали противоречивые результаты корреляции между титром антител и иммунитетом у КРС при контрольном заражении [182,198 ,199].

Разработанная реакция нейтрализации в клеточных культурах, чувствительных к вирусу ящура [119,169,191,210], для определения нейтрализующих антител к вирусу ящура *in vitro* позволяла с достоверностью установить корреляцию между титрами нейтрализующих антител после вакцинации и защитой КРС при контрольном заражении [187,200 ,211]. Как было определено, самая высокая корреляция в сыворотках КРС или свиней обнаруживается при контрольном заражении через 3-4 недели, после вакцинации [121,196].

Серологические методы для определения иммуногенности противоящурных вакцин использовали многие авторы. Лукам и соавт. [164] в 1964 разработали метод определения индекса SN, который применялся в то время официальными контролирующими органами Франции в качестве дополнительного метода тестирования к методу определения индекса К. В этом тесте групповой средний титр не менее 1,5 SN₅₀ был приемлемым уровнем. Стельман и соавт. [117] в 1968 очень изящно продемонстрировали, что иммуногенность противоящурной вакцины можно оценить по средним титрам SN₅₀, которые индуцируются вакцинами у КРС, более точно, чем методом контрольного заражения с использованием результата с конечным числом возможных значений [93,184].

Большинство этих методов основано на строго специфическом взаимодействии антител с антигеном, что позволяет быстро обнаружить, антитела и определить их титр. Несмотря на внедрение в вирусологическую практику многих методов

обнаружения антител, одним из основных тестов остается реакция нейтрализации. Для ее постановки используют разные модификации, но все они основаны на едином принципе специфической нейтрализации антителами инфекционной активности вируса, проявляющейся характерными симптомами болезни или гибелью лабораторных животных и цитопатическим действием на культурах ткани. Активность вакцины определяют по уровню антител в сыворотке крови привитых сельскохозяйственных животных (крупный или мелкий рогатый скот, свиньи). Возможно также установление активности вакцины по уровню вируснейтрализующих антител у привитых лабораторных животных (кролики, морские свинки, мыши, крысы, цыплята). Однако такая косвенная оценка имеет существенные недостатки в силу различий в иммунном ответе животных, а также ошибки при экстраполивании процента защиты лабораторных животных на сельскохозяйственных.

Для титрования сывороточных антител используют различных животных и культуры клеток, но наибольшее применение нашли мышата-сосуны и первично-трипсинизированные культуры клеток (СП, БП).

Существует два основных способа постановки реакции нейтрализации: определение 50%-ного нейтрализующего эффекта сыворотки и установление индекса нейтрализации:

1) различные разведения сыворотки (в основном 1:2, 1:4, 1:8; до 1:256 - 1:512) смешивают с одной и той же дозой вирус (100 ИД₅₀ - 500 ИД₅₀). Смесь инкубируют в течении 60 минут при 37°C, а затем определяют остаточную инфекционную активность, используя культуры клеток, куриные эмбрионы или лабораторных животных. После учета летальности зараженных животных или цитопатогенного эффекта в культуре уровень вируснейтрализующей активности сыворотки выражают как разведение, защищающее 50 % животных от гибели или клетки от разрушения, вызываемого вирусом;

2) одинаковое количество сыворотки, проверяемой на антитела и возрастающие разведения вируса смешиваются, инкубируются в течении 60 минут при 37°C, с последующим определением инфекционной активности в культуре клеток или лабораторных животных. Индексом нейтрализации считается число минимальных инфекционных доз, нейтрализованных определенным разведением сыворотки.

При изучении противоящурных сывороток на наличие вирусоспецифических антител были испытаны обе схемы постановки реакции нейтрализации. Ряд исследователей считают, что более надежным является метод, предусматривающий использование постоянных количеств вируса [210].

Другие исследователи предпочитают при постановке реакции нейтрализации использовать постоянное количество сыворотки [117,202].

По вопросу о температуре и оптимальном времени связывания смеси вируса и сыворотке в литературе существуют различные данные. Одни исследователи считают, что смесь сыворотки и вируса необходимо инкубировать в течение 60 минут при 37°C. Другие авторы считают, что смесь необходимо инкубировать в течение 24 часов при 4°C или 26°C. Обычный метод постановки реакции нейтрализации в пробирках с культурой ткани требует значительного расхода сыворотки и вируса, поэтому используются микромодификации реакции на пластиковых пластинах с лунками [87].

Впервые реакцию микронейтрализации (PMH) для ящура описали авторы [212], для этого на пластиковых планшетах с микролунками выращивают монослой чувствительной культуры клеток (IBRS-2, ВНК-21, РК-15 или другие), после чего в лунки помещают смесь сыворотки с вирусом. Реакцию учитывают после фиксации и окрашивания монослоя [136,171,201]. Другая модификация PMH предполагает одновременное внесение суспензии культуры клеток в лунки микропанелей, содержащие инкубированную смесь вируса с сывороткой [125,212]. Учет реакции

проводится визуально с использованием инвертированного микроскопа. Титром сыворотки является ее конечное разведение в смеси сыворотка/вирус, которое нейтрализует 100 ТЦД₅₀ в 50% конечного разведения, расчет производят по методу Кербера [157]. С целью сокращения сроков исследования ставят цветную пробу. Для этого используют интенсивно размножающиеся клеточные суспензии с определенной концентрацией клеток.

У вакцинированного крупного рогатого скота антитела появляются на 3— 7-й после прививки и достигают максимального титра на 14— 21 -й день после вакцинации [87].

В литературе имеются и другие данные. Так, венгерские ученые [104] проверили иммуногенность противоящурных вакцин на 253 головах КРС.

Полностью контрольное заражение выдержала 141 голова КРС, первичные афты были у 56 голов КРС, а у 56 - была генерализованная форма ящура. Через 21 день после вакцинации у этих животных вируснейтрализующие антитела были выявлены в титрах 6,25 log₂; 5,19 log₂ и 4,0 log₂ соответственно. Эти результаты позволили авторам сделать выводы о том, что 80%-ная защита КРС, обеспечивается при титре вируснейтрализующих антител 5,0 log₂ и выше. В тоже время ряд исследователей показали необходимость подбора критериев уровней антител, обеспечивающих защиту от ящура для каждого типа вируса [202].

Уровень защиты от контрольного заражения подвержен большим вариациям и трудно интерпретируем при титре антител от 1:8 до 1:32 [200,201].

Все это свидетельствует о необходимости выбора критериев уровня вируснейтрализующих антител к каждому типу (штамму) вируса ящура. Так, в серии опытов на 180 головах крупного рогатого скота в возрасте 18 - 20 месяцев было установлено, что 70 - 100% защита от вируса Азия-1 может быть создана при наличии вируснейтрализующих антител в крови вакцинированных животных в титрах от 6.3 до 8.3 log₂ , тогда как такая же защита против вируса

A_{22} обеспечивается при титре антител в диапазоне от 4.7 до $5.7 \log_2$ [30].

Наряду с реакцией нейтрализации для определения уровня противоящурных антител используются и другие методы, в том числе:

- 1) реакция серозащиты;
- 2) реакция угнетения связывания комплимента (РУСК);
- 3) реакция радиальной иммунодиффузии (РРИД) [39,79].

Существенным недостатком серологических методов определения противоящурных антител является необходимость стандартизации диагностических наборов, валидации и установления корреляции между уровнем антител и защитой животных от заражения [168].

С начала 90-х годов для определения уровня противоящурных антител чаще всего используют иммуноферментный анализ [17,153,154].

Описано несколько вариантов иммуноферментного анализа, используемых для определения уровня антител к вирусу ящура, в т. ч. непрямой жидкофазный конкурентный; твердофазный конкурентный [17,90,153,154].

В руководстве ВОЗЖ по диагностическим тестам и вакцинам указано, что в жидкофазном конкурентном варианте ИФА диагностическим титром является разведение сыворотки 1:40 и выше, однако не приведены критерии защитного уровня противоящурных антител, являющимися оценочным уровнем эффективности противоящурной вакцины [168].

В тоже время согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», указано, что иммунными к ящуру считают животных, сыворотки которых активны в разведении 1:32. Пробы сывороток с активностью 1:16 исследуют повторно и при получении аналогичного результата, они также считаются положительными [34].

Рахманов А. М. и соавт. [71] в опытах на 200 головах КРС установили, что животные с титром антител в ИФА 1:32 и выше защищены от ящура [46].

Аргентинские исследователи установили, что среди животных вакцинированных против ящура типов О и А24 с титром антител в жидкофазном конкурентном варианте ИФА 1.85 lg, было защищено от ящура 81% из 17 голов [141].

Исследователь из Института Фридриха Леффлера [о. Риме, Германия], В. Хаас, провел исследование 20 серий сорбированных и эмульсионных противоящурных вакцин типов А, О и Азия-1. Было установлено, что вакцинированные против ящура типа А животные с титром антител в жидкофазном конкурентном ИФА - 2,4 lg и животные иммунизированные против ящура типом Азия-1 с уровнем антител 2.8 lg, защищены против контрольного заражения [151].

1.4.2. Противовирусный поствакцинальный иммунитет

Противоящурные вакцины из инактивированного вируса стимулируют полноценный иммунный ответ с включением всех факторов клеточного и гуморального иммунитета, а также механизмов неспецифической защиты [87].

Вакцинация против ящура имеет несколько целей: 1) сокращение числа заболевших при инфицировании вирусом стада; 2) сокращение или прекращения циркуляции вируса ящура.

После вакцинации обнаруживаются вирусоспецифических антител к структурным белкам вируса. Существует взаимосвязь между уровнем антител и уровнем защиты и можно установить пороговое количество антител, которое приравнивается к тому или иному уровню защиты отдельного животного [61].

Уровень антител в сыворотке при котором обеспечивается защита определяется с помощью РН или ИФА [39,46,48,49], что позволяет эти реакции использовать для определения эффективности вакцинации и уровня защитного иммунитета в привитых популяциях.

В последнее время распространен конкурентный твердофазный ИФА (КТ-ИФА) [89] и другие виды ИФА с использованием моноклональных антител

[105,166], однако эти исследования не всегда позволяют получить данные показывающие корреляцию с защитой.

Barnett P.V., et al. [143] показали, что значение титров ВНА определённых в РН и защитой при контрольном заражении для серотипов А, О, Азия-1 равнялись 1,5 lg обеспечивающие 50% защиту животных.

Muradei M., et al [122] установили корреляцию между титрами вирусоспецифических антител, определенных в ИФА и ожидаемой процентом защиты 75% для четырех вакцинных штаммов в пределах 1,9-2,2 lg.

Другие исследователи [122] определили по результатам РН, что средней титр антител от 1,2 до 1,6 lg или 2,0 и более по результатам ИФА для образцов крови отобранных через 21 или 28 ДПВ, свидетельствует об удовлетворительной защите вакцинированных.

В рекомендациях ВОЗЖ предлагается использовать ИФА а именно — его конкурентный жидкофазный вариант и РМН. Однако пока еще нет единого мнения о критериях защитного уровня поствакцинальных антител, выявляемых с помощью различных модификаций ИФА, поэтому необходимы исследования в этом направлении. В «Руководстве ВОЗЖ по диагностическим тестам и вакцинам» [139] указано, что в жидкофазном варианте ИФА диагностическим тестом при ящуре следует считать положительную реакцию при исследовании сыворотки крови в разведении больше, чем 1:40, а при показаниях, близких к 1:40, сыворотки надо перепроверять в реакции вирус нейтрализации. Подчеркивается, что интерпретация результатов титрования сывороток крови может быть разной в различных лабораториях. О защитном уровне антител при этом ничего не сообщается. В то же время указывается, что для оценки иммуногенности противоящурных вакцин применим учет уровня поствакцинальных антител, определяемых в различных реакциях [95,122].

1.6 Иммуноферментный анализ в диагностике ящура

Иммуноферментный анализ является одним из наиболее широко используемых методов серологической диагностики ящура благодаря высокой чувствительности, специфичности, возможности автоматизации и отсутствию необходимости работы с живым вирусом [1]. С момента своего внедрения в диагностическую практику в 1980-х годах, метод претерпел значительные усовершенствования и сегодня представлен несколькими форматами, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения.

1.6.1 История разработки ИФА для диагностики ящура

Первые попытки применения ИФА для диагностики ящура были предприняты в начале 1980-х годов группой исследователей под руководством Hamblin C. и соавт. [153]. Изначально был разработан непрямой ИФА, который позволял выявлять антитела к структурным белкам вируса ящура в сыворотках крови. Однако этот формат имел ряд недостатков, включая высокий уровень неспецифических реакций и сложность интерпретации результатов при исследовании сывороток разных видов животных [153].

Значительным прорывом стала разработка конкурентного блокирующего ИФА (C-ELISA) и его модификаций. Фактически, комбинации различных форматов ИФА позволили создать эффективные тест-системы как для обнаружения антигенов вируса ящура, так и для выявления антител к различным структурным и неструктурным белкам вируса [215].

Ferris N.P. и Dawson M. в 1988 году провели сравнительное исследование применения ИФА и реакции связывания комплемента (РСК) для диагностики ящура и везикулярной болезни свиней, показав преимущества ИФА по чувствительности и специфичности [215]. Этот труд стал важным шагом в признании ИФА как надежного диагностического инструмента.

1.6.2 Различные форматы ИФА для диагностики ящура

Непрямой ИФА

В непрямом формате ИФА антиген вируса ящура адсорбируется на твердой фазе, после чего добавляются исследуемые сыворотки. Образовавшиеся комплексы антиген-антитело выявляются с помощью антивидовых конъюгатов, меченных ферментом [154]. Основным недостатком метода является необходимость использования специфических конъюгатов для каждого вида животных, что ограничивает его применение в рутинной диагностике.

Конкурентный ИФА

В конкурентном формате исследуемые антитела конкурируют с мечеными антителами за связывание с антигеном [215]. Этот формат обеспечивает более высокую специфичность и позволяет исследовать сыворотки различных видов животных без изменения протокола. Sørensen K.J. и соавторы [193] продемонстрировали эффективность конкурентного ИФА для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител на основе выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура.

Жидкофазный блокирующий ИФА (LPBE)

LPBE представляет собой модификацию конкурентного ИФА, в котором реакция антиген-антитело происходит в жидкой фазе, что повышает чувствительность метода. Исследования Маскау D.K. и соавт. продемонстрировали, что LPBE обладает высокой чувствительностью и позволяет детектировать антитела на более ранних сроках после вакцинации или инфекции. Одним из важных преимуществ LPBE является возможность количественной оценки титра антител, что особенно важно при контроле эффективности вакцинации. Robiolo B. и соавт. предложили использовать LPBE в качестве альтернативы контрольному заражению

при оценке потенции вакцин против ящура в Аргентине, что значительно упростило процедуру контроля качества вакцин [166].

Валидация и стандартизация ИФА для ящура

Валидация и стандартизация тест-систем на основе ИФА являются ключевыми аспектами их практического применения. Wright P.F. и соавт. [194] подробно описали подходы к стандартизации и валидации ИФА для выявления антител при инфекционных заболеваниях, включая определение аналитической и диагностической чувствительности и специфичности, воспроизводимости и надежности метода.

Raiba G.A. и соавт. [207] провели валидацию твердофазного конкурентного ИФА (SPCE) для скрининга антител к вирусу ящура, что позволило внедрить этот метод для масштабных эпизоотологических исследований. Авторы определили диагностическую чувствительность метода на уровне 97,2% и специфичность 99,5%, что подтверждает высокую надежность тест-системы.

Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) рекомендует использовать валидированные тест-системы на основе ИФА для контроля ящура и включает соответствующие методики в Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных [167]. Это обеспечивает единый подход к диагностике заболевания во всех странах-членах МЭБ.

Современные коммерческие тест-системы

На рынке представлено множество коммерческих тест-систем на основе ИФА для диагностики ящура. Они различаются по формату, используемым антигенам и антителам, а также целевому применению.

Одним из важных направлений является разработка тест-систем для дифференциации вакцинированных и инфицированных животных (DIVA). Jaworski J.P. и соавт. [208] провели валидацию ИФА на основе рекомбинантного белка 3AB1 для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота.

Тест показал высокую диагностическую чувствительность (95,4%) и специфичность (97,2%), что делает его ценным инструментом для программ контроля и ликвидации ящура.

Yang M. и соавт. [120] разработали быструю и простую методологию для выявления вируса ящура серотипов О, А и Азия 1 с использованием универсального экспресс-теста. Эта разработка особенно ценна для применения в полевых условиях, когда необходимо быстро принять решение о проведении противоэпизоотических мероприятий.

Применение ИФА для дифференциации вакцинированных и инфицированных животных (DIVA)

Одной из ключевых задач в контроле ящура является дифференциация вакцинированных и инфицированных животных. Стратегия DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) основана на выявлении антител к неструктурным белкам вируса ящура, которые образуются только при инфекции, но не при вакцинации животных очищенными вакцинами [193,105].

Brocchi E. и соавт. [105] провели сравнительную оценку шести тест-систем на основе ИФА для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура. Исследование показало, что тест-системы различаются по чувствительности и специфичности, но все они способны эффективно дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных при правильном выборе порогового значения.

Clavijo A. и соавт. [109] обобщили достижения в разработке диагностических методов для дифференциации инфекции и вакцинации при ящуре. Авторы отмечают, что ИФА на основе неструктурных белков стал важным инструментом для эпизоотологического мониторинга и контроля заболевания, особенно в странах, где проводится систематическая вакцинация животных.

Перспективы развития ИФА для диагностики ящура

Несмотря на значительные достижения, продолжается совершенствование тест-систем на основе ИФА для диагностики ящура. Chen Н.Т. и соавт. [186] разработали метод быстрого типирования вируса ящура серотипа Азия 1 с использованием обратной транскрипции и петлевой изотермической амплификации (RT-LAMP), что позволяет сократить время анализа и повысить его чувствительность.

Ma L.N. и соавт. [96] представили обзор техник ИФА для диагностики ящура, отмечая, что совершенствование метода идет по пути повышения чувствительности, специфичности, сокращения времени анализа и упрощения процедуры. Авторы также отмечают перспективность применения рекомбинантных антигенов и моноклональных антител для повышения стандартизации тест-систем.

Raton D.J. и соавт. [178] обсуждают варианты контроля ящура с точки зрения знаний, возможностей и политики. Авторы подчеркивают важность современных диагностических методов, включая ИФА, для эффективного контроля заболевания и отмечают необходимость дальнейшего совершенствования тест-систем, особенно для применения в полевых условиях.

1.7 Заключение по литературному обзору

Ящур является самым контагиозным заболеванием млекопитающих и обладает огромным потенциалом для нанесения серьезного экономического ущерба в отношении парнокопытных животных.

При решении задачи совершенствования новых средств защиты животных от ящура необходимо исходить из анализа эффективности существующих противоящурных вакцин в полевых условиях.

Борьба с ящуром заключается в проведении профилактической вакцинации восприимчивых животных в зонах высокой степени риска заноса инфекции.

По мнению отечественных и зарубежных ученых от возможных спорадических вспышек ящура не застрахована ни одна страна, т.к. риск заноса вируса из соседних эндемичных по ящура стран всегда существует из-за интенсивно развивающихся взаимоотношений между государствами.

Противоящурная вакцинация естественно-восприимчивых животных с применением качественных вакцин эффективна при ликвидации очагов инфекции и экономически оправдана.

Напряженность и продолжительность поствакцинального иммунитета при ящуре в первую очередь зависит от количества и качества антигена в вакцине. Уровень защиты и титры вирусоспецифических антител зависят от количества 146S антигена в вакцине.

Для оценки иммуногенности вакцины разработаны прямые и косвенные методы.

Прямой метод предусматривает устойчивость естественно восприимчивых к ящуру животных, привитых проверяемой вакциной, к контрольному заражению через 21-28 суток дозой $10^4 \text{ ИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ гомологичного вируса.

Косвенные методы определения иммуногенности вакцины основаны на измерении уровней вирусоспецифических антител в РН, в ЖБ ИФА могут быть использованы если установлена корреляция между процентом защиты на КРС в остром опыте и титром антител у вакцинированных животных.

Прямой метод является “золотым стандартом” определения иммуногенности вакцины против ящура. Основным недостатком его является использование активного вируса, специальных помещениях с высоким уровнем биозащиты т.к. работа с активным вирусом требует специальных мер защиты от попадания вируса в окружающую среду.

Поэтому большую актуальность приобретает разработка и внедрение серологических тест-систем для оценки эффективности вакцинации, напряжённости

иммунитета у вакцинированных животных и оценка качества выпускаемых противоящурных вакцин.

Поскольку все серологические методы основаны на взаимодействии антител с антигеном, первостепенное значение при создании качественных тест-систем при ящуре имеет получение высокоспецифических препаратов антиген/антитела.

Основная цель таких тестов по определению количества вирусоспецифических антител является достижение результатов корреляции разрабатываемого теста и контрольного заражения.

Использование серологических методов оценки контроля вакцины направлены на снижение финансовых затрат с получением результата в максимально короткие сроки.

Иммуноферментный анализ, в различных форматах, является эффективным инструментом для серологической диагностики ящура и оценки поствакцинального иммунитета. Современные тест-системы обладают высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью, что делает их незаменимыми в программах контроля и ликвидации этого заболевания. Особое значение имеют тест-системы для дифференциации вакцинированных и инфицированных животных, которые позволяют проводить эффективный эпизоотологический мониторинг в регионах с систематической вакцинацией животных.

Дальнейшее совершенствование метода направлено на повышение его доступности, специфичности и адаптации к различным эпизоотическим ситуациям. Разработка экспресс-тестов, использование рекомбинантных антигенов и комбинация ИФА с молекулярно-генетическими методами являются перспективными направлениями развития диагностики ящура.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Материалы

Вирус. Для научной работы использовали штаммы вируса ящура, которые применяются в лаборатории профилактики ящура для производства вакцины.

Из Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» были получены:

- штамм «А №2155/Забайкальский/2013», полученный путем адаптации к репродукции в первично-трипсинизированной культуре клеток СП, в перевиваемых культурах клеток ВНК-21, IB-RS-2, ПСГК-30, в организме свиней и крупного рогатого скота в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

- штамм «О №2212/Приморский/2014», полученный путем адаптации к репродукции в первично-трипсинизированной культуре клеток СП, в перевиваемых культурах клеток ВНК-21, IB-RS-2, ПСГК-30, в организме свиней и крупного рогатого скота в условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Культура клеток. В работе использовали клеточные системы:

- Baby hamster kidney (ВНК-21), которая представляет из себя суспензионную перевиваемую клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка.

- монослойную первично-трипсинизированную культуру клеток из почки свиньи (СП);

- монослойную перевиваемую культуру клеток из почки сибирского горного козерога (ПСГК-30);

- почки свиньи (IB-RS-2).

Животные. В экспериментах использовались следующие виды животных:

- морские свинки короткошёрстной породы массой 400 - 500 г для получение гипериммунной вирусоспецифической сыворотки (детекторные антитела);

- кролики породы Советская шиншилла массой 2 – 3 кг для получения гипериммунной вирусоспецифической сыворотки (сенсibiliзирующие антитела);
- свиньи массой 30 - 50 кг 4 - 5 месячного возраста для получение гипериммунных вирусоспецифических сывороток и контроля активности эмульсионных вакцин.

Растворы.

Для получения антигена вируса ящура и компонентов набора применяли следующие растворы.

Буферный раствор.

Двадцатикратный концентрат. 46,8 г NaCl растворяли в 600 см³ очищенной воды, затем добавляли 27,4 г Трис-HCl и 3,2 г трис (оксиметил) аминотан, измеряли pH раствора, который должен быть в диапазоне 7,4 - 7,6 и доводили общий объём до 1000 см³ водой для инъекций. На последней стадии вносили 20 см³ Твин-20.

Пятидесятикратный концентрат. 117 г NaCl растворяли в 1500 см³ воды для инъекций, затем добавляли 68,5 г Трис-HCl и 8 г трис (оксиметил) аминотан, измеряли pH раствора, который должен быть в диапазоне 7,4 - 7,6 и доводится общий объём до 1000 см³ водой для инъекций. На последней стадии вносили 50 см³ Твин-20.

Раствор использовали для приготовления рабочего раствора для межэтапной промывки планшетов и подготовки проб для исследования, а также как основу для приготовления рабочего буферного раствора для разведения детекторных антител и иммунопероксидазного конъюгата.

Фосфатно-буферный раствор (ФБР). Раствор стерильный, pH 7,4-7,6; 0,05 М.

Карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), раствор №1. 0,01 М карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,5–9,6, готовили растворением в воде очищенной коммерческого препарата КББ - порошка из капсулы в объёме 100 см³ или таблетки в 50 см³.

Рабочий буферный раствор №2 для межэтапной промывки планшетов и подготовки проб для исследования. Рабочий раствор готовили из концентрата буфера путем доведения 100 см³ (20X концентрат) или 40 см³ (50X концентрат) раствора до 2000 см³ водой для инъекций.

Рабочий буферный раствор №3 для разведения детекторных антител и иммунопероксидазного конъюгата. Готовили из раствора №2 с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС. Для этого к 36 см³ раствора №2 добавляли 4 см³ фетальной сыворотки КРС.

Раствор сахарозы. Раствор 20 – 50 % сахарозы готовили растворением 20,0 - 50,0 г сахарозы в воде для инъекций, доводя вес до 100,0 г. Растворы использовали для приготовления градиента сахарозы с целью получения 146S антигена ВЯ.

Раствор, останавливающий реакцию («стоп»-раствор). Раствор, останавливающий окраску - 2% раствор додецилсульфата натрия (ДСН) готовили путем растворения 2,0 г порошка додецилсульфата натрия в 50 см³ водой для инъекций. Затем объем доводили до 100 см³.

Оборудование.

- Дозатор переменного объема 1-канальный (Модель: Biohit Proline, Sartorius. 1-канальный с переменным объёмом 1-5 см³; 20-200 мкл; 2-20 мкл)
- Дозатор переменного объема 8-канальный (Модель: Biohit Proline, Sartorius. Восьмиканальный переменного объема от 5 до 50 мкл; от 50 до 300 мкл;)
- Шейкер-инкубатор (Модель Орбитальный шейкер-инкубатор ES -20 Biosan с платформой UP-12)
- Весы (Модель: AND GR-200. Максимальная нагрузка 210 г).
- Весы (Модель: ViBRA AB-12001RCE. Максимальная нагрузка 12000 г).
- Ультрацентрифуга (Модель Beckman coulter optima L-80 XP ultracentrifuge. Скорость вращения от 1000 до 100 000 об/мин.

- Центрифуга высокоскоростная (Модель: Beckman coulter Avantu J-26XP. Скорость вращения от 100 до 26000 об/мин).
- Центрифуга настольная лабораторная (Модель: Allegra X-22R. Скорость вращения до 16 000 об/мин (с шагом 100 об/мин).
- Прибор для проведения вертикального электрофореза в ПААГе (Модель PowerPac Basic, BioRad).
- Фотометр для микропланшетов (Модель: «iMark», Bio Rad – 8-канальный фотометр с вертикальным световым потоком для измерения поглощения содержимого лунок 96-луночных планшетов. Спектральный диапазон от 400 до 750 нм;
- Устройство для промывки микропланшетов (Модель: «Immuno Wash 1575», Bio Rad. Конфигурация промывочной головки – 8- и 12-канальная;)
- pH-метр (Модель: pH метр HANNA 2210. Диапазон: pH от 2,00 до 16,00; температур от -20 до 120 °C.)
- Механический степпер для дозирования веществ (Модель: Multipette M4, Eppendorf. Степпер механический с электронным дисплеем, 0,1-10 см³).
- Насос перистальтический (Модель: Hei-FLOW Precision06. Имеет водонепроницаемые панели; Скорость от 20 до 600 об/мин).
- Насос перистальтический (Модель: 730SN/R Watson-Marlow. Максимальная производительность: 3300 л/ч, Минимальная производительность: 0,12 л/ч Давление 2 бар при использовании трубочных элементов LoadSure. Температура эксплуатации: 5 - 40 °C).
- Фотометр (Модель: Eppendorf D-30. Принцип измерения: детектирующий поглощение однолучевой спектрометр с опорным лучом).
- Бокс абактериальной воздушной среды (Модель: БМБ II «Ламинар-С»-1,5. Электропитание 220 В $\pm 10\%$; 50-70 Гц $\pm 1\%$).

Диагностические наборы.

- Наборы для определения противоящурных антител в сыворотке животных в ИФА (производство ФГБУ “ВНИИЗЖ”) Тип О серия 081222.
- Наборы для определения противоящурных антител в сыворотке животных в ИФА (производство ФГБУ “ВНИИЗЖ”) Тип А серия 071222.
- Набор PrіoCHECK FMDV Type O, Prionics (Нидерланды-Швейцария), Type A.
- Сыворотки от свиней, иммунизированных вакциной серии №141020 производства ФГБУ “ВНИИЗЖ”

Вакцины.

- Эмульсионная вакцина “АРРИАХ-ВАК” бивалентная из штаммов А/Забайкальский/2013 и О/Приморский/2014 серии №141020.
- Вакцина эмульсионная бивалентная из штаммов А/Забайкальский/2013, О/Приморский/2014 с адъювантом Montanide ISA-206.
- Бивалентная эмульсионная вакцина с адъювантом Montanide ISA-207 из штаммов А/Забайкальский/2013, О/Приморский/2014.
- Вакцина эмульсионная бивалентная из штаммов из штаммов А/Забайкальский/2013, О/Приморский/2014 с Montanide ISA-50.
- Вакцина эмульсионная с адъювантом “ВНИИЗЖ” из штаммов А/Забайкальский/2013, О/Приморский/2014.

Методы.

Инактивация вируса. Для инактивации вируса ящура использовали раствор аминоэтилэтиленимина в конечной концентрации 0,03% при рН 7,2-7,8 в течение 12 часов при температуре 37°C.

Для очистки суспензии вируса от балластных белков, включая неструктурные протеины, использовали ПГМГ в конечной концентрации 0,005%.

Кроликам эмульсию вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,3$ мг/см³ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,25$ мг/см³ на одну иммунизацию в объеме 2 см³. Вакцинация проводилась дважды с интервалом 14 дней.

Морским свинкам эмульсию так же вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,15$ мг/см³ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,1$ мг/см³ на одну иммунизацию в объеме 1 см³. Вакцинацию проводили дважды с интервалом 14 дней.

Получение сенсibilизирующих антител к структурным белкам вируса ящура. Для получения сенсibilизирующих антител иммунизировали кроликов 2 раза высокоочищенным антигеном масляной эмульсией с концентрацией белка О/Приморский/14 $C \approx 0,3$ мг/см³ А/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,25$ мг/см³. Препарат в объеме 1 см³ вводили внутримышечно каждому животному. Спустя 21 сутки проводили повторную иммунизацию в той же дозе. Через 10-12 дней после последней иммунизации животных обескровливали, полученную кровь отстаивали при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 ± 5 мин, а затем при температуре $2-8^\circ\text{C}$ – в течение 18-20 часов. Отобранные сыворотки объединяли и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут, а затем проверяли на активность и специфичность в жидкофазном блокирующем «сэндвич» - варианте ИФА.

Перед лиофилизацией к сыворотке добавляли сахарозу до конечной концентрации 5%. В итоге получали сенсibilизирующие антитела против структурных белков штаммов вируса ящура.

Получение детекторных антител к структурным белкам вируса ящура. Для получения детекторных антител иммунизировали морских свинок 2 раза высокоочищенным антигеном масляной эмульсией с концентрацией белка О/Приморский/14 $C \approx 0,15$ мг/см³ А/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,1$ мг/см³. Препарат в

объёме 1 см^3 вводили внутримышечно каждому животному. Спустя 21 сутки проводили повторную иммунизацию в той же дозе. Через 10-12 дней после последней иммунизации животных обескровливали, полученную кровь отстаивали при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 ± 5 мин, а затем при температуре $2-8^\circ\text{C}$ в течение 18-20 часов и отбирали сыворотку. Сыворотки объединяли и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут, затем проверяли на активность и специфичность в жидкофазном блокирующем «сэндвич» - варианте ИФА.

Получение конъюгата против IgG морской свинки, входящего в состав набора для диагностики ящура. Иммунопероксидазный конъюгат (коммерческий препарат). Проверку конъюгата на пригодность и определение оптимальной концентрации проводили в ИФА. Перед лиофилизацией к раствору конъюгата добавляли сахарозу до конечной концентрации 5% и БСА до 5%.

Реакция нейтрализации (РН). Реакцию нейтрализации вируса ящура (РН) проводили в первично--трипсинизированной культуре клеток СП по общепринятой методике с двукратным разведением сыворотки и постоянной дозой вируса (100TCID_{50}).

Реакция микронеutralизации (PMH). Постановку PMH осуществляли в перевиваемой клеточной линией IB-RS-2 микрометодом с использованием 96-луночных плоскодонных культуральных планшетов. К двукратным разведениям исследуемых и контрольных образцов сыворотки крови на питательной среде Игла MEM добавляли примерно $102 \text{ TCID}_{50}/0,05 \text{ см}^3$ (тканевая цитопатическая доза вируса), вызывающая гибель 50% клеток), допустимый диапазон $101,5-102,5 \text{ TCID}_{50}/0,05 \text{ см}^3$. Затем после инкубирования в течение 1 часа при 37°C в присутствии 5% CO_2 в каждую лунку планшета вносили по $0,1 \text{ см}^3$ суспензии культуры клеток IB-RS-2 в концентрации 10^6 клеток/ см^3 , инкубировали в тех же условиях в течение 48-78 часов. Реакцию учитывали по мере развития цитопатического действия вируса (ЦПД) в

контрольных лунках с заражённой культурой клеток без сыворотки крови от исследуемых животных. За титр вируснейтрализующих антител (ВНА) принимали последнее разведение сыворотки, тормозящее на 50% ЦПД вируса.

Реакция связывания комплимента (РСК). Определение количества 146S+75S компонентов. Количество иммуногенных компонентов вируса ящура (146S+75S частиц) определяли методом РСК согласно стандартному протоколу, разработанному и применяемому в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Изготовление эмульсионных вакцин. Для изготовления моновалентных эмульсионных вакцин использовали концентрированный антиген, который предварительно был инактивирован. Этот концентрат антигена хранили при температуре от 2 до 8 градусов Цельсия до момента изготовления образцов вакцины. В качестве адъюванта использовали Montanide ISA-206, ISA-207, ISA-50, адъювант «ВНИИЗЖ». Концентраты антигена и адъювантов были смешаны в соотношении 1:1 по массе. Далее полученную эмульсию тщательно перемешивали для достижения однородности.

Постановка реакции ИФА.

1) Сенсibilизация планшетов. Раствор сенсibilизирующих антител готовили в оптимальном разведении в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе. Во все лунки иммунологического 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора сенсibilизирующих антител, инкубировали в течение 18 - 20 часов при температуре (2 - 8) °С. Данный этап проводили заранее до осуществления непосредственных этапов постановки реакции.

2) Реакция в жидкой фазе. Осуществляли двойное промывание лунок планшета с помощью буферного раствора TBST. Параллельно с сенсibilизацией планшета проводили реакцию антигена с испытуемыми и контрольными пробами сыворотки крови. Готовили следующие разведения сывороток крови животных: 1:16,

1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. Для этого во все лунки полимерного планшета за исключением лунок Н1-6, которые оставляли для контроля антигена (КА) и контроля конъюгата (КК), вносили по 0,047 см³ буферного раствора и 0,003 см³ пробы. В лунки Н1-6 вносили по 0,05 см³ буферного раствора. В качестве контроля 1 использовали положительную сыворотку крови КРС против инактивированного вируса ящура (процент ингибиции $\geq 75\%$), контроля 2 - положительную сыворотку крови КРС к инактивированному вирусу ящура (процент ингибиции более 50%, но менее 75%), контроля 3 – нормальную сыворотку КРС. Затем во все лунки планшета добавляли по 0,05 см³ рабочего разведения антигена. После перемешивания содержимого лунок планшета его инкубировали в течение 18 часов при температуре (2 - 8) °С.

3) Улавливание антигена. В промытые лунки сенсibilизированного планшета вносили по 0,05 см³ смеси контрольных и испытуемых проб и антигена, планшеты инкубировали в течение 1 часа при температуре (37±2) °С. Лунки планшета промывали 4 раза.

4) Внесение детекторных антител. Во все лунки планшета, за исключением лунок с КК, куда добавляли по 0,05 см³ буферного раствора, вносили по 0,05 см³ рабочего разведения детекторных антител. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при температуре (37±2) °С. Проводили промывание лунок планшета 4 раза.

5) Внесение конъюгата. Во все лунки планшета вносили по 0,05 см³ рабочего разведения пероксидазного конъюгата антител против антител морской свинки. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при температуре (37±2) °С. Планшеты промывали 4 раза.

6) Проявление цветной реакции. Во все лунки планшета вносили по 0,05 см³ хромогенного субстрата АВТС, выдерживали 15-20 минут при температуре (18 - 25)°С.

7) Остановка реакции. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета 0,05 см³ 1% раствора додецилсульфата натрия.

8) Учет результатов ИФА. Результаты анализа учитывали инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряли оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке при длине волны 405 нм, используя спектрофотометр-ридер для микропланшетов с вертикальным лучом света. Значения ОП контрольных и исследуемых проб переводили в значение процента ингибиции (PI) по формуле:

$$PI = (1 - \frac{ОП_{пробы} - ОП_{КК}}{ОП_{КА} - ОП_{КК}}) \times 100\%, \text{ где}$$

ОП пробы – среднее значение оптической плотности смеси исследуемой или контрольной пробы с антигеном вируса ящура;

ОП КА - среднее значение оптической плотности контроля антигена;

ОП КК - среднее значение оптической плотности контроля конъюгата.

Результаты реакции считали достоверными, если они удовлетворяли следующим критериям:

- разница между значениями ОП КА и ОП КК не менее 0,4 оптических единиц;
- контроль 1 имеет значение $PI > 75\%$;
- контроль 2 имеет значение PI в пределах 50-75%;
- контроль 3 имеет значение $PI < 50\%$.

Пробы, демонстрирующие значение $PI \geq 50\%$, считали положительными, а животные, от которых получены данные пробы сыворотки крови, иммунные к антигену вируса ящура. Значение $PI < 50\%$ является отрицательным, что свидетельствует об отсутствии специфических антител к антигену вируса ящура в сыворотке крови обследуемых животных. Исходя из полученных данных брали последнее разведение сыворотки, для которого процент ингибиции составляет $\geq 50\%$. Это разведение считали титром антител против вируса ящура.

На следующем этапе исследования определяли стандартные диагностические показатели разработанной тест-системы. Для оценки чувствительности предложенной

тест-системы анализировали 450 сывороток крови животных, которые являлись заведомо положительными по данным реакции нейтрализации в чувствительной клеточной линии почки свиньи IB-RS-2. Титр антител для данных сывороток крови находился в диапазоне 1:32-1:1024. Постановку ИФА проводили, как отражено выше. Разработанной тест-системой определили, что из 450 истинно положительных образцов сывороток 449 определены в качестве положительных, а 1 – в качестве отрицательной (титр 1:16).

Для исследования специфичности метода тестировали 190 отрицательных сывороток крови. В результате исследования с помощью ИФА определили, что из 190 истинно отрицательных проб 190 определены в качестве отрицательных.

Пользуясь представленными выше статистическими методами анализа выявили, что диагностическая чувствительность (DSe) составила 99,78% (в 95%-ном доверительном интервале 98,77 - 99,99%), диагностическая специфичность (DSp) – 100% (в 95%-ном доверительном интервале 98,08 - 100,0%), k-критерий – 0,996; прогностичность положительного результата (PPV) – 100%, прогностичность отрицательного результата (NPV) – 99,48% (в 95%-ном доверительном интервале 96,41 - 99,93%), общая точность (DAc) – 99,84% (в 95%-ном доверительном интервале 99,13 - 100,00%).

Статистический анализ. Статистический анализ производили с помощью интернет-ресурсов, в том числе, MedCalc's Diagnostic test evaluation calculator (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php), Kappa Calculator (<https://www.easycalculation.com/statistics/cohens-kappa-index.php>).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка тест-систем на основе антигена вируса ящура штаммов

«А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014»

Особое внимание при получении иммуноспецифических компонентов для жб ИФА с целью обнаружения антител к структурным белкам вируса ящура генотипов А/ASIA/SEA-97 и О/SEA/Mya-98 было уделено выделению 146S частиц из культуральной вируссодержащей инактивированной суспензии. В диагностических тест-системах использование очищенного 146S компонента позволяет выявлять именно те антитела, которые обладают вируснейтрализующей активностью и коррелируют с защитой от инфекции. Таким образом, сохранение целостности 146S частиц в процессе получения вирусного антигена является критически важным фактором для разработки как эффективных вакцин, так и высокоспецифичных диагностических тест-систем.

Опыты по инаktivации вирусов ящура проводили с использованием инактивантов аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ) в концентрации 0,03% и бинарным этиленимином (БЭИ) в концентрации 0,003М, который готовили непосредственно перед использованием путем циклизации бромэтиламина гидробромида в присутствии 0,15 N едкого натрия при температуре 37 °С в течении 60 минут при периодическом перемешивании. Раствор инактиванта вносили в культуральную суспензию вируссодержащую суспензию и смесь нагревали до 37С° и инкубировали 12 и 24 часа.

Влияние очистки и инаktivации на сохранность 146S частиц вируссодержащей суспензии. Проводили культивирование вируса ящура указанных выше штаммов в культиваторе стеклянном (КС-40), после чего были проведены опыты по инаktivации возбудителя заболевания с использованием БЭИ и 1,2-АЭЭИ. Результаты данных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние времени инактивации с помощью БЭИ и 1,2-АЭЭИ на количество 146S компонента антигенов вируса ящура типов А и О

(n=3, M±m, p<0,05)

Тип вируса ящура	Режимы инактивации температура, 37°С		Концентрация 146S компонента (мкг/см ³) после	
	название инактиванта, концентрация	время воздействия, ч	Репродукции	Инактивации
А	0,003М БЭИ 37°	12 ч	2,31	2,20
	0,003М БЭИ 37°	12 ч	1,91	1,85
	0,003М БЭИ 37°	12 ч	2,0	2,0
M±m			2,07±0,14	2,02±0,11
О	0,003М БЭИ 37°	12 ч	2,62	2,51
	0,003М БЭИ 37°	12 ч	1,91	1,90
	0,003М БЭИ 37°	12 ч	2,37	2,0
M±m			2,32±0,19	2,14±0,22
А	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	2,31	2,21
	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	1,91	1,81
	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	2,0	1,87
M±m			2,07±0,14	1,96±0,14
О	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	2,62	2,51
	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	1,91	1,77
	0,03% АЭЭИ 37°	12 ч	2,37	2,21
M±m			2,32±0,19	2,16±0,23
А	0,003М БЭИ 37°	24 ч	2,31	2,0
	0,003М БЭИ 37°	24 ч	1,91	1,83
	0,003М БЭИ 37°	24 ч	2,0	1,91
M±m			2,07±0,14	1,91±0,26
О	0,003М БЭИ 37°	24 ч	2,62	2,43
	0,003М БЭИ 37°	24 ч	1,91	1,90
	0,003М БЭИ 37°	24 ч	2,37	2,21
M±m			2,32±0,19	2,18±0,17
А	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	2,31	1,91
	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	1,91	1,90
	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	2,0	1,71
M±m			2,07±0,14	1,84±0,08
О	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	2,62	2,50
	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	1,91	1,73
	0,03% АЭЭИ 37°	24 ч	2,37	2,07
M±m			2,32±0,19	2,10±0,23

Примечание: АЭЭИ - 1,2-аминоэтилэтиленмин, БЭИ -бинарный этиленмин.

Опыты по инаktivации вирусов ящура проводили с использованием инаktivантов аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ) в концентрации 0,03% и бинарным этиленимином (БЭИ) в концентрации 0,003М, который готовили непосредственно перед использованием путем циклизации бромэтиламина гидробромида в присутствии 0,15 N едкого натрия при температуре 37 °С в течении 60 минут при периодическом перемешивании. Раствор инаktivанта вносили в культуральную суспензию вирусодержащую суспензию и смесь нагревали до 37С_о и инкубировали 12 и 24 часа.

Результаты, представленные в таблице 1, показали, что после инаktivации БЭИ снижение количества 146S компонента за 12 часов инкубации вируса типов О и А составило 7,76% и 2,42%, соответственно, а после инаktivации 1,2-АЭЭИ – 6,90% и 5,31%, соответственно, по сравнению количеством 146S компонента до инаktivации.

Увеличение периода инкубации с инаktivантами до 24 часов с БЭИ снизило количество 146S компонента для типов О и А – на 6,03% и 7,73%, соответственно, а с АЭЭИ за это время для типа О – на 9,48 %, а для типа А – на 10,97%. Таким образом, для инаktivации в дальнейшем решили применять БЭИ при концентрации 0,003М, температуре 37,0±0,1°С и времени инкубации 12 ч.

Отсутствие инфекционности вируса в инаktivированной суспензии подтверждали 3-х кратным пассированием в первичной культуре клеток СП.

В последующих опытах для получения сывороток от морских свинок использовали антигены инаktivированные 0,03% АЭЭИ и 0,003М БЭИ в течении 12 часов.

Таким образом, для инаktivации в дальнейшем использовали БЭИ при режиме инаktivации 12 ч.

В производстве инаktivированных вакцин важную роль играет очистка вирусодержащей суспензии от балластных белков, которые затрудняют адсорбцию вируса на гидроокиси алюминия (ГОА), увеличивают реактогенность готового

препарата. В настоящее время при очистке культурального вируса применяют полигексаметиленгуаниди гидрохлорид (ПГМГ) – катионный полиэлектролит, обладающий уникальным сочетанием физико-химических и бактерицидных свойств, которые позволяют ему использоваться во многих отраслях народного хозяйства. В производстве культуральных инаktivированных вакцин против ящура применяют растворы с конечной концентрацией 0,005-0,03% (рН 7,6 - 8,0). Флокулированные балластные белки отделяют центрифугированием, сепарированием или отстаем. Увеличение концентрации ПГМГ в суспензии выше 0,03% приводит к значительным потерям вируса.

Определение флокулирующих свойств партии ПМГМ основано на исследовании мутности вирусосодержащей суспензии 0,2,4,6,8,24 часа при добавлении полисепта до конечной концентрации 0,005; 0,007; 0,01%. Работу проводили с 20%-ом раствором ПГМГ. В флаконы с культуральной вирусосодержащей суспензией добавляли ПГМГ и выдерживали при температуре 2-4 °С в течение 24 часов, после чего определяли мутность и количество общего вирусного белка и компонентов вируса ящура.

Мутность полученных растворов определяли на портативном тубидиметре в соответствии с инструкции производителя и выражали в FNU (формазиновая единица мутности). Результаты исследований отражены в рис.1

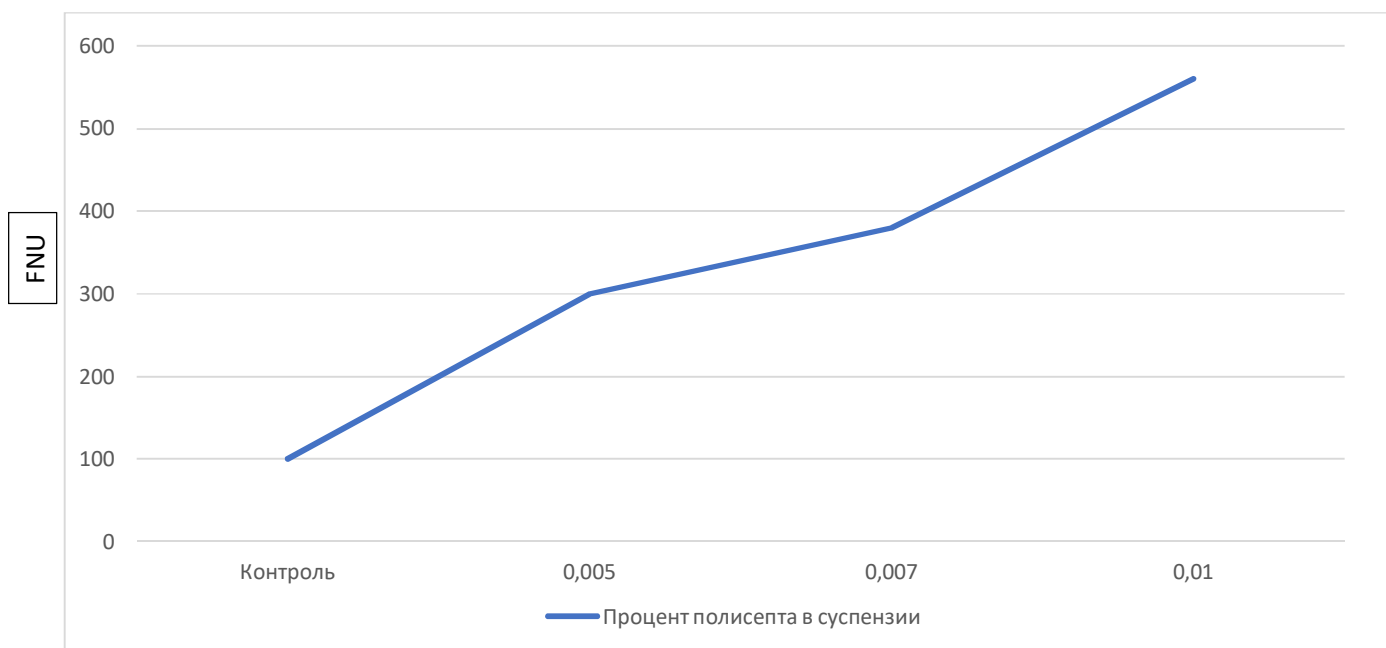


Рисунок 1 – Динамика изменения мутности при добавлении разных количеств полисепта.

Было отмечено, что с увеличением количества флокулянта мутность образцов увеличивалась (рис.1) от $100 \pm 20,3$ до $580 \pm 19,3$ FNU.

Эффективность процесса флокуляции, размер и плотность образующихся хлопьев зависит от интенсивности перемешивания и количества флокулянта. Результаты исследования надосадочной жидкости после осаждения в различные периоды времени отражены на рисунке 2.

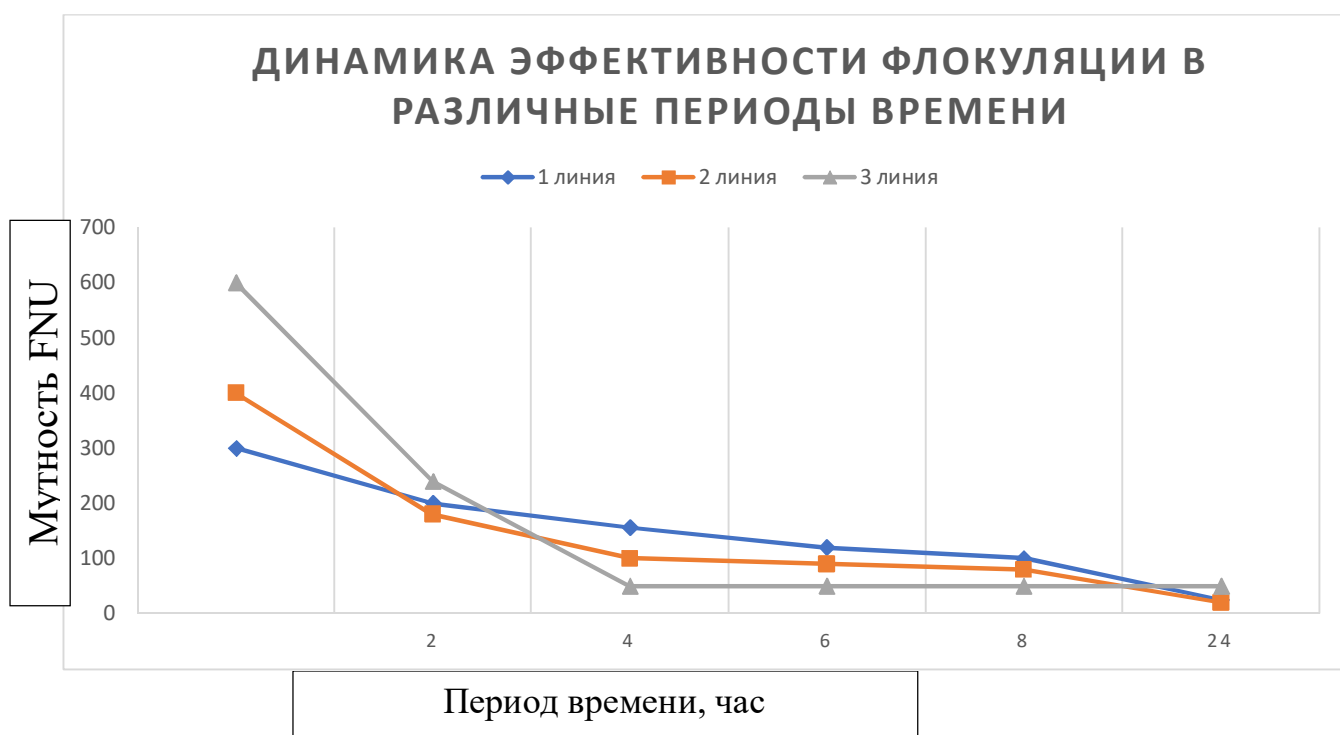


Рисунок 2 – Влияние концентрации ПГМГ и времени на эффективность флокуляции белков

Примечание: 1 линия – 0,005%; 2 линия – 0,007%; 3 линия – 0,01%.

Мутность в надосадочной жидкости составляла 8,62 FNU, а через 24 часа мутность образцов с 0,005% и 0,007% полисепта равнялась 25 и 20 единицам FNU соответственно.

В следующих опытах определяли влияние концентрации ПГМГ на компонентный состав вируса ящура. В образцы инаktivированной вирусосодержащей суспензии вносили полисепт до концентрации 0,005; 0,007; 0,01%, отстаивали 72 часа при температуре 2-8 °С и определяли количество иммуногенных компонентов. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние полисепта на компонентный состав вируса ящура типа О

Название флокулянта	Количество 146S компонентов (мкг/см ³)			
	Исходная суспензия	После внесения флокулянта (%)		
		0,005	0,007	0,010
ПГМГ	2,37±0,06	2,26±0,05	2,23±0,08	1,90±0,05
	3,05±0,04	2,91±0,09	2,87±0,09	2,44±0,06
	2,51±0,07	2,39±0,07	2,36±0,04	2,01±0,09
	2,58±0,06	2,46±0,04	2,43±0,05	2,06±0,07
Среднее арифметическое значение/ Изменение по отношению к исходной суспензии	2,63/(100%)	2,51/(-4,6%)	2,47/(-6%)	2,10/(-20%)

Примечание: ПГМГ – полигексаметиленгуанидин (полисепт).

Анализ результатов предоставленных в таблице 2 показал, что увеличение концентрации полисепта при очистке вирусосодержащей суспензии снижает количество иммуногенных компонентов 146S+75S. Использование для очистки 0,005%; 0,007%; 0,01% полисепта уменьшило количество иммуногенных компонентов на 4,6; 6 и 20% соответственно по сравнению с исходной вирусосодержащей суспензией.

Таким образом в дальнейшем полученную инактивированную вирусосодержащую суспензию очищали полисептом в концентрации 0,005%, так как при этой концентрации наименьшие потери по иммуногенным компонентам.

3.2 Усовершенствование тест-системы жб ИФА при определения вируснейтрализующих антител после вакцинации

3.2.1 Получение антигена вируса ящура

Антиген серотипов А и О для реакции ЖБ ИФА и иммунизации животных готовили из культуральной вирусосодержащей суспензии. Вирус штаммов А/Забайкальский/2013 и О/Приморский/2014, накапливали в культуре клеток ВНК-21/2-17, инактивировали 0,003М БЭИ при рН – 7,2 – 7,8 в течении 12 часов и

температуре 37 °С, затем вносим ПГМГ до концентрации 0,005%, смесь охлаждали до 4-6 °С и отстаивали в течении 24 часов.

Очищенную вируссодержащую суспензию концентрировали методом ультрафильтрации в 10 раз по объему и опять очищали 0,005% флокулянта с последующим центрифугированием. Далее концентрирование антигена проводили путем преципитации вирусного белка 8%-м полиэтиленгликолем молекулярной массой 6000 (ПЭГ-6000) с добавлением 0,85% NaCl в течении 18-24 часов при 4°С. Смесь центрифугировали, далее осадок ресуспендировали в 10 раз меньшем объеме ФБР, затем дополнительно очищали хлороформом и центрифугированием.

Для последующего выделения 146S антигена проводили ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (10-50% сахарозы в ФБР). Белковая полоса, содержащая 146S компонент, располагается приблизительно в 30%-м слое сахарозы, и выделяется опалесценцией. В этом случае отбирали последнюю верхнюю фракцию 50%-го слоя (1,0 см³), все фракции 30%-го слоя (5,0 см²) и нижнюю фракцию 20%-го слоя сахарозы (1,0 см²), преципитат антигена.

Фракционированный антиген анализировали спектрометрически при длине волны 260 нм, и электрофоретически с помощью концентрирующий гель: 4-5% акриламида и разделяющий гель в 12 %-м полиакриламидном геле при постоянном напряжении 200V.

Результаты спектрометрического исследования полученных фракций антигена вируса ящура генотипа A/ASIA/SEA-97 в виде антигенного профиля представлены на рисунке 3. Анализ проводили для 14 фракций, пики наблюдали для фракций №4-7.

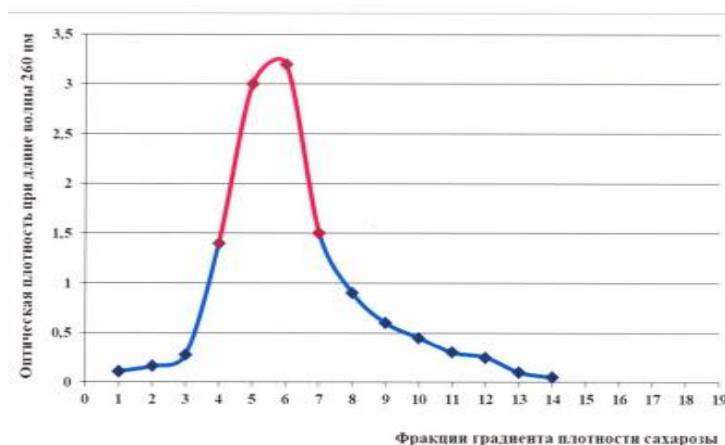


Рисунок 3 – спектральный профиль фракций антигена «А/Забайкальский/2013»

Результаты спектрометрического исследования полученных фракций антигена вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генетической линии О/SEA/Mya-98 в виде антигенного профиля представлены на рисунке 4. Анализ проводили для 21 фракций, высокие значения оптической плотности наблюдали для 6-12 фракций с максимальными значениями для восьмой фракции.

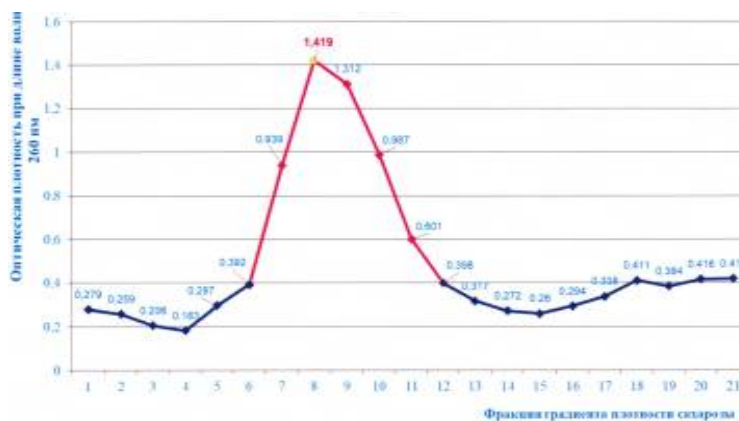


Рисунок 4 - спектральный профиль фракций антигена «О/Приморский/2014»

Выделение 146S антигена проводили ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (20-50% сахарозы в ФБР).

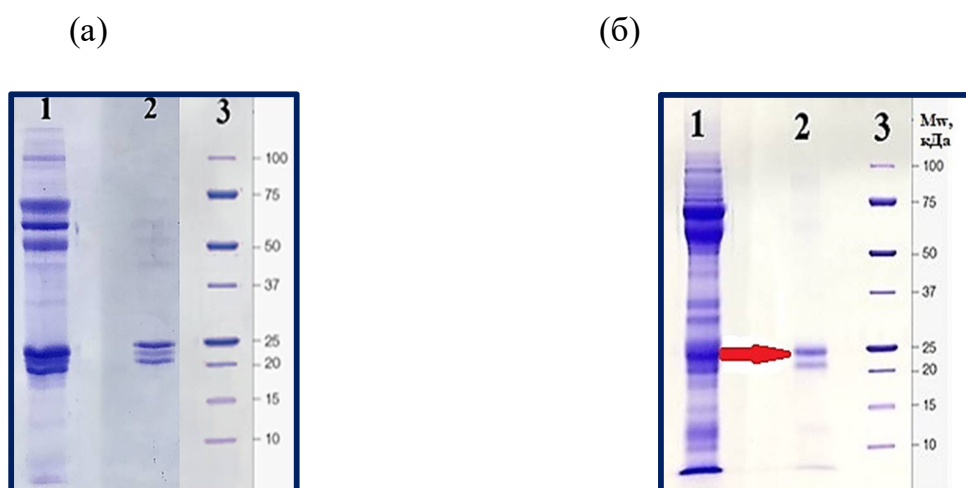


Рисунок 5 – Электрофореграмма для антигена вируса ящура серотипов А и О в 12% полиакриламидном

а) «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97

б) «О №2212/ Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98

Примечание: целевой белок с молекулярным весом 25 кДа, 1 – до ультрацентрифугирования; 2 – после ультрацентрифугирования, 3 - маркер молекулярных весов для электрофореза белков.

Приготовленный таким образом антиген смешивали с масляным адьювантом ISA-51 VG 1:1 в равных частях. Для иммунизации животных использовалась схема, отраженная ниже.

Кроликам эмульсию вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,3$ мг/см³ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,25$ мг/см³ на одну иммунизацию в объеме 2 см³. Вакцинация проводилась дважды с интервалом 14 дней.

Морским свинкам эмульсию так же вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,15$ мг/см³ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,1$ мг/см³ на одну иммунизацию в объеме 1 см³. Вакцинация проводилась дважды с интервалом 14 дней.

После последней иммунизации, через 10 дней проводили обескровливание животных для получения сыворотки. Отобранные сыворотки проверяли на активность в РН.

3.2.2 Определение активности антигена, сенсibiliзирующих и детекторных антител к вирусу ящура штамма «О №2212/ Приморский/2014» генетические линии O/SEA/Mya-98 и штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа A/ASIA/SEA-97

Антиген смешивали с адъювант ISA-207 1:1 и вводили внутримышечно кроликам, свиньям в дозе 2см³, морским свинкам – 1см³.

Для получения детекторных антител морским свинкам весом 450-500 г делали 2 внутримышечные инъекции антигена вируса ящура соответствующего типа.

Второе введение делали на 21 день для усиления иммунного ответа. После последней иммунизации, через 10-12 дней, производится обескровливание животных для извлечения сыворотки. Сыворотку отстаивали при температуре 37±0,5°С в течение 60±5 мин, а затем отстаивали при температуре 4-8°С в течение 18 часов. Отобранные сыворотки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут, затем проверяли на активность и специфичность в реакции жб ИФА.

Для количественного определения белка использовали спектрофотометр при длине волны 260 нм. Это позволило определить концентрацию белка в смеси и контролировать успешность процесса получения детекторных антител.

Для получения сенсibiliзирующих антител иммунизировали кроликов 2 раза соответствующим инактивированным антигеном вируса ящура, эмульгированного в равном объёме масляного адъюванта. Препарат в объёме 2 см³ вводили внутримышечно каждому животному. Спустя 21 день проводили повторную иммунизацию в той же дозе. Через 10-12 дней после последней иммунизации животных обескровливали, полученную кровь отстаивали при температуре 37±0,5°С в течение 60±5 мин, а затем при температуре 4-8°С в течение 18 часов. Отобранные

сыворотки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут, затем проверяли на активность и специфичность в реакции жб ИФА. Важно соблюдать указанные промежутки времени и условия температуры при обработке полученной крови для максимального выхода сывороток с нужными антителами.

Полученные антитела лиофилизировали для увеличения срока годности препарата. Перед лиофилизацией к сыворотке добавляли сахарозу до конечной концентрации 5%.

Индивидуальные пробы сывороток проверяли на активность и специфичность в жидкофазном блокирующем непрямом «сэндвич»-варианте ИФА. Был проведен подбор оптимальных рабочих разведений указанных компонентов для получения достоверных результатов в ИФА. Полученные данные анализа представлены в таблицах 3, 4, 5.

Для анализа исследовали следующие разведения антигена: 1:2000, 1:3000, 1:3500, 1:4000. Разведения остальных компонентов были постоянны: для детекторных антител - 1:4500, для сенсibiliзирующих антител - 1:9000, конъюгата - 1:2000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256.

Из результатов, представленных в таблице 3 следует, что при разведении антигена 1:3500 достигалось получение достоверного результата (1:256 или $8 \log_2$). При меньших разведениях наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат. При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных.

При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Таблица 3 - Рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Муа-98 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=3)

Исследуемые сыворотки	Разведение антигена вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Муа-98			
	1:2000	1:3000	1:3500	1:4000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{крс} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{свиней} -О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{крс} - О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} -О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{крс} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{крс} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура,

Разведение антигена – 1:3500

Разведение детекторных антител – 1:4500

Разведение конъюгата – 1:2000

Все специфические сыворотки с активностью 1:256

ОТР – отрицательно.

Таблица 4 – Рабочие разведения сенсibilизирующих антител к антигену вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=3)

Исследуемые сыворотки	Разведение сенсibilизирующих антител к антигену вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014»			
	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{крс} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{свиней} -О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{крс} - О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} -О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{крс} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{крс} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура, разведение антигена – 1:3500; разведение детекторных антител – 1:4500; разведение конъюгата – 1:2000; все специфические сыворотки с активностью 1:256; ОТР – отрицательно.

Для анализа исследовали следующие разведения сенсibilизирующих антител: 1: 7000, 1:8000, 1:9000, 1:10000. Разведения остальных компонентов были постоянны:

для антигена - 1:3500, для детекторных антител - 1:4500, конъюгата - 1:2000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256. Из таблицы 4 следует, что при разведении сенсibiliзирующих антител 1:9000 достигалось получение достоверного результата (1:256 или $8 \log_2$). При меньших разведениях антител наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат.

При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных. При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Для анализа исследовали следующие разведения детекторных антител: 1:3000, 1:4000, 1:4500, 1:5000. Разведения остальных компонентов были постоянны: для антигена - 1: 3500, для сенсibiliзирующих антител - 1:9000, конъюгата - 1:2000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256. Из данных таблицы 5 следует, что при разведении детекторных антител 1:4500 достигалось получение достоверного результата (1:256 или $8 \log_2$ SN50). При меньших разведениях антител наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат. При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных. При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Таблица 5 – Рабочие разведения детекторных антител к антигену вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=3)

Исследуемые сыворотки	Разведение детекторных антител к антигену вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014»			
	1:3000	1:4000	1:4500	1:5000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{крс} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Манисса/1993	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:16-1:32
S _{свиней} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Тайвань/3/97	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - О/Приморский/2012	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{крс} - О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{свиней} -О/Сауд. Аравия/2008	ОТР	ОТР	1:16-1:32	1:24-1:32
S _{крс} - О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} -О/Забайкальский/2016	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{крс} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} – Тип А	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{крс} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	1:16-1:24	1:12-1:16	ОТР	ОТР
S _{крс} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{крс} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура, разведение антигена – 1:3500; разведение детекторных антител – 1:4500; разведение конъюгата – 1:2000; все специфические сыворотки с активностью 1:256
ОТР – отрицательно.

Таким образом, в ходе лабораторных исследований доказано, что рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98, сенсibilизирующих и детекторных антител составили 1:3500, 1:9000, 1:4500, соответственно.

Определение активности антигена вируса ящура штамма «А/Забакальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97, сенсibilизирующих и детекторных антител.

Образцы пробы сывороток проверяли на активность и специфичность в жидкофазном блокирующем непрямом варианте ИФА. Был проведен подбор оптимальных рабочих разведений указанных компонентов для получения достоверных результатов в ИФА. Полученные данные анализа представлены в таблицах 6, 7, 8.

Для анализа исследовали следующие разведения антигена: 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000. Разведения остальных компонентов были постоянны: для детекторных антител - 1:4000, для сенсibilизирующих антител - 1:9000, конъюгата - 1:3000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256.

Из результатов, представленных в таблице 6 следует, что при разведении антигена 1:3000 достигалось получение достоверного результата (1:256 или 8,0 log₂). При меньших разведениях наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат. При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных.

При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Таблица 6 – Рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=3)

Исследуемые сыворотки	Разведение антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97			
	1:1500	1:2000	1:3000	1:3500
S _{КРС} -А №/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} -А №/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90- 1:128	1:256	≥1:512
S _{КРС} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{свиней} - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{КРС} - - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:24-1:32
S _{свиней} - А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура, разведение антигена – 1:3000; разведение детекторных антител – 1:4000; разведение конъюгата – 1:3000; все специфические сыворотки с активностью 1:256; ОТР – отрицательно.

Для анализа исследовали следующие разведения сенсibilизирующих антител: 1: 7000, 1:8000, 1:9000, 1:10000. Разведения остальных компонентов были постоянны: для антигена - 1:3000, для детекторных антител - 1:4000, конъюгата - 1:3000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256. Из данных таблицы 7 следует, что при разведении сенсibilизирующих антител 1:9000 достигалось получение достоверного результата (1:256 или $8,0 \log_2$). При меньших разведениях антител наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат. При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных. При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Для анализа исследовали следующие разведения детекторных антител: 1:3000, 1:3500, 1:4000, 1:4500. Разведения остальных компонентов были постоянны: для антигена - 1: 3500, для сенсibilизирующих антител - 1:9000, конъюгата - 1:3000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью 1:256. Из данных таблицы 8 следует, что при разведении детекторных антител 1:4000 достигалось получение достоверного результата (1:256 или $8 \log_2$ SN50). При меньших разведениях антител наблюдали высокие фоновые значения, что не позволяло получить корректный результат. При большем разведении наблюдали увеличение детектируемого значения титра антител в сыворотках крови животных. При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

При исследовании неспецифических и отрицательных сывороток отмечали отрицательные результаты, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанного способа.

Таблица 7 – Рабочие разведения сенсibilизирующих антител к антигену вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=3)

Исследуемые сыворотки	Разведение сенсibilизирующих антител к антигену вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013»			
	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000
S _{КРС} - А/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} - А/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90- 1:128	1:256	≥1:512
S _{КРС} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{свиней} - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{КРС} - - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:24-1:32
S _{свиней} - А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура; разведение антигена – 1:3000; разведение детекторных антител – 1:4000; разведение конъюгата – 1:3000; все специфические сыворотки с активностью 1:256; ОТР – отрицательно.

Таблица 8 – Рабочие разведения детекторных антител к антигену вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97 в жидкофазном «сэндвич» - варианте ИФА

(n=10)

Исследуемые сыворотки	разведение детекторных антител к антигену вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013»			
	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000
S _{КРС} - А/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} - А/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90- 1:128	1:256	≥1:512
S _{КРС} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Турция/2006	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{свиней} - А/Иран/2018	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	<1:12-1:12
S _{КРС} - - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{свиней} - А ₂₂ Ирак/1964	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{свиней} - А/Афганистан/2017	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:12-1:16
S _{КРС} - А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	<1:12-1:12	1:24-1:32
S _{свиней} А/ВНИИЗЖ/2015	ОТР	ОТР	1:12-1:16	1:24-1:32
S _{КРС} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип О	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Тип С	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - Азия-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-1	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-2	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{свиней} - SAT-3	ОТР	ОТР	ОТР	ОТР
S _{КРС} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
S _{свиней} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: S – сыворотки против того или иного штамма вируса ящура, разведение антигена – 1:3000; разведение детекторных антител – 1:4000; разведение конъюгата – 1:3000; все специфические сыворотки с активностью 1:256; ОТР – отрицательно.

Таким образом, в ходе лабораторных исследований доказано, что рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97, сенсibiliзирующих и детекторных антител составили 1:3000, 1:9000, 1:4000, соответственно.

В качестве положительных контролей в ИФА использовали сыворотку крови от вакцинированных против ящура животных. Крупный рогатый скот и свиней вакцинировали согласно программе проведения опыта по проверке вакцины. Через 21-28 дней после вакцинации отбрали кровь.

Индивидуальные пробы крови выдерживали сначала при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 60 ± 5 мин, а затем при температуре $4 - 8^\circ\text{C}$ в течение 18 часов. Отстоявшуюся сыворотку отбирали в стерильные пробирки, не допуская попадания эритроцитов и других форменных элементов крови, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15-20 минут, затем проверяли на активность и специфичность в реакции ИФА. На основании полученных результатов готовили раствор положительной сыворотки добавляя сахарозу до конечной концентрации 5%.

Сформировали наборы тест-систем, которые использовали для оценки уровней вирусоспецифических антител у животных, вакцинированных экспериментальными образцами эмульсионных вакцин.

3.3 Валидационные характеристики разработанных тест-систем

Разработанной тест-системой на серотип О определили, что из 498 образцов сывороток крови 492 определены в качестве положительных, а 6 - в качестве отрицательных (определен титр - 1:24). Для исследования специфичности метода тестировали 232 отрицательные сыворотки крови животных. В результате исследования с помощью ИФА определили, что из 232 отрицательных проб - 231 определены в качестве отрицательных. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Матрица для подсчета диагностических характеристик тест-системы ИФА тип О

Статус животных	Тип О		Всего
	Положительные	Отрицательные	
Вакцинированных против ящура серотипа О	492	6	498
Не вакцинированных	1	231	232
Всего	493	237	720

Пользуясь представленными выше статистическими методами анализа определили, что в 95%-ном доверительном интервале диагностическая чувствительность (DSe) составила 98,56-99,95%, диагностическая специфичность (DSp) - 98,42-100,00%, ккритерий - 0,994, прогностичность отрицательного результата (NPV) - 96,68-99,78%, общая точность (DAc) - 99,02-99,97 (таблица 10).

Таблица 10 – Валидационные характеристики тест-системы для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич» варианта ИФА

Диагностические показатели	Результаты статистической обработки (данные представлены в 95%-ном доверительном интервале)
DSe	98,56-99,95%
DSp	98,42-100,00%
k-критерий	0,994
NPV	96,68-99,78
DAc	99,02-99,97

Разработанной тест-системой на серотип А определили, что из 349 образцов сывороток крови 341 определены в качестве положительных, а 8 - в качестве отрицательных (определен титр - 1:22). Для исследования специфичности метода тестировали 362 отрицательных сывороток крови животных. В результате

исследования с помощью ИФА определили, что из 362 отрицательных проб - 355 определены в качестве отрицательных. Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Матрица для подсчета диагностических характеристик тест-системы ИФА тип А

Статус животных	Тип А		Всего
	Положительные	Отрицательные	
Вакцинированных против ящура серотипа А	341	8	349
Не вакцинированных	7	355	362
Всего	348	363	711

Пользуясь представленными выше статистическими методами анализа определили, что в 95%-ном доверительном интервале диагностическая чувствительность составила 98,67-99,99%, диагностическая специфичность - 98,03-100,00%, k критерий - 0,998; прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата - 96,31-99,92%, общая точность - 99,08-100,00% (таблица 12).

Таблица 12 - Валидационные характеристики тест-системы для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич» варианта ИФА

Диагностические показатели	Результаты статистической обработки (данные представлены в 95%-ном доверительном интервале)
DSe	98,67-99,99%
DSp	98,03-100,00%
k-критерий	0,998
NPV	96,31-99,92%
DAc	99,08-100,00%

В разработанных тест-системах в основу качественного анализа результатов реакции ИФА заложен позитивно негативный порог (ПНП) в 50% РІ. Расчёт производили по данным, полученным в ходе тестирования 126 образцов сыворотки крови от клинически здоровых КРС и свиней, не вакцинированных против ящура. Были получены среднее значение РІ и стандартное отклонение от среднего (SD). Среднее значение РІ по данной выборке образцов сыворотки крови (n=126) для тест-системы, полученной с использованием штамма «А №2155/Забайкальский/2013» составило 26,1%, SD – 11,56%. ПНП составил 49,22%. Для тест-системы, изготовленной с применением штамма «О №2212/Приморский/2014», среднее значение РІ по данной выборке образцов сыворотки крови (n=126) составило 24,4%, SD – 12,68%, ПНП составило 49,76% для данной выборке образцов.

Таким образом предлагаемые «Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/ SEA/Муа-98 и штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА» является специфичной и чувствительной, позволяющей проводить анализ сывороток крови животных с количественным определением значения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Муа-98 и штамма «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97, которые входят в состав вакцинных препаратов против ящура (приложения 6 и 7) .

3.4 Результаты исследований гуморального иммунитета у вакцинированных эмульсионными вакцинами животных методом ЖБ ИФА и в реакции нейтрализации

Для работы использовали масляные адъюванты Montanide ISA-50, ISA-206, ISA-207 и адъювант “ВНИИЗЖ”, инаktivированные и концентрированные ультрафильтрацией антигены А/Забайкальский/2013 и О/Приморский/2014. Были изготовлены четыре образца эмульсионных вакцин, которые в течении суток после изготовления хранили при температуре 2-8°C. Провели тесты на стабильность, стерильность, вязкость определяли с помощью капиллярного вискозиметра ВНЖ. Результаты вязкости образцов вакцин представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты исследования вязкость образцов

№ образцов	Наименование образцов	Вязкость мм ² /с
1	Вакцина эмульсионная с ISA-206	92,7
2	Вакцина эмульсионная с ISA-207	90,65
3	Вакцина эмульсионная с ISA-50	639,5
4	Вакцина эмульсионная с адъювантом “ВНИИЗЖ”	102,8

Как видно из таблицы 13 наибольшая вязкость была в вакцине, изготовленной на Montanide ISA-50.

Каждый образец вакцины был использован для иммунизации 10 свиней: 5 голов получили дозу 1 см³ внутримышечно, а другие 5 голов – дозу в 0,5 см³ подкожно. Схема вакцинации свиней представлены в таблице 14.

Таблица 14. – Схема вакцинации свиней

№ образцов	Характеристика вакцины	№ животных	Доза вакцины (см ³)	Способ введения
1.	АГ+ISA-206	1-5	1,0	в/м
		6-10	0,5	п/к
2.	АГ +ISA-207	11-15	1,0	в/м
		16-20	0,5	п/к
3.	АГ +ISA-50	21-25	1,0	в/м
		26-30	0,5	п/к
4.	АГ+ВНИИЗЖ	31-35	1,0	в/м
		36-40	0,5	п/к

Примечание АГ – антиген, ISA – обозначение масляного адъюванта с разным уровнем вязкости; ВНИИЗЖ – адъювант отечественного производства.

Через 14 дней после вакцинации у животных отобрали образцы крови для определения уровня вирусоспецифических антител в сыворотке в реакции РН и ИФА. Результаты исследований сывороток крови вакцинированных животных на 14 сутки после вакцинации отражены в таблице 15 и 16.

Анализ результатов таблицы 15 показал, что защитный уровень вирусоспецифических антител через 14 суток после вакцинации определили у одного животного против вируса типа А и у пяти против вируса типа О. В реакции нейтрализации с защитным уровнем ВНА определили трое животных против вируса А и два против вируса типа О (образец 1). Из пяти животных, вакцинированных препаратом №2, по результатам ЖБ ИФА имели защитные титры против вируса А три подсвинки и пять против вируса типа О. По результатам РН четыре животных из пяти имели защитные уровни ВНА (5,0 и более $\log_2$) против вируса А и два подсвинка против типа О (образец №2).

Таблица 15 – Результаты исследований уровней вирусоспецифических антител у свиней через 14 дней после вакцинации, при внутримышечном введении

Характеристик вакцины	Значение титров вирусоспецифических антител против ВЯ в ИФА ($\log_2$)		Значение титров ВНА против ВЯ в РН ($\log_2$)	
	A2155	O2212	A2155	O2212
№1 Эм. ISA-206 в/м - 1 см^3	<5,0	7,0	5,50	3,75
	<5,0	7,0	5,0	2,75
	6,0	8,0	5,5	5,50
	<5,0	7,0	4,25	5,25
	<5,0	5,0	2,0	1,50
К-во защищенных	(1/5)	6,80±1,10 (5/5)	4,45±1,46 (3/5)	3,75±1,69 (2/5)
№2 Эм. ISA-207 в/м - 1 см^3	<5,0	7,0	5,0	5,50
	<5,0	6,0	5,50	1,50
	6,0	7,0	5,50	4,25
	5,0	6,0	5,50	5,50
	5,0	6,0	3,50	4,50
К-во защищенных	3/5	6,48±0,55 (5/5)	5,00±0,87 (4/5)	4,25±1,64 (2/5)
№3 Эм. ISA-50 в/м – 1 см^3	<5,0	5,0	2,50	1,50
	5,0	6,0	4,25	3,25
	6,58	6,0	5,50	1,50
	<5,0	6,0	2,25	1,50
	<5,0	7,0	2,00	1,50
К-во защищенных	2/5	6,00±0,71 (5/5)	3,30±1,51 (1/5)	1,85±0,48 (0/5)
№4 Эм. “ВНИИЗЖ” – 1 см^3	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	5,0	1,50	1,75
	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	1,75	1,50
	6,0	7,0	4,0	3,00
К-во защищенных	1/5	2/5	2,05±1,10 (0/5)	1,55±0,11 (0/5)

Примечание: защитный уровень вирусоспецифических антител в жб ИФА 1:32, в РН – 5,0 $\log_2$ Числитель количества защищенных животных; знаменатель количества вакцинированных животных

Из пяти подсвинков, вакцинированных вакциной №3 с типом эмульсии “вода в масле” по результатам ЖБ ИФА имели защитные титры вирусоспецифических

антител против вируса типа А два животных и пять животных против вируса О. По результатам РН один подсвинok имел защитный уровень антител против типа А, а против вируса типа О уровня защиты не имели все пять подсвинков.

Как следует из результатов таблицы 11 выраженным стимулирующим действием обладали вакцины изготовленные с Montanide ISA-206 и 207 при внутримышечном введении.

Эти же образцы вакцин были испытаны при подкожном способе введения в дозе 0,5 см³. Результаты определения гуморального иммунитета у подсвинков при подкожном введении представлены в таблице №16.

Данные таблицы 16 показывают, что из пяти подсвинков, вакцинированных на 14 СПВ препаратом №1, защитные уровни по результатам ЖБ ИФА имели три подсвинка против вируса О и один против вируса типа А, в тоже время результаты полученные с использованием реакции нейтрализации не установлены защитное количество ВНА как против вируса А так и против вируса О.

При подкожном введении препарата №2, защитные уровни вирусоспецифических антител были установлены методом ЖБ ИФА у двух из пяти подсвинков против вируса типа О.

По результатам РН, защитные уровни антител отсутствуют против вирусов серотипов А и О.

В группе из пяти подсвинков, вакцинированных вакциной №3 по результатам ЖБ ИФА по два подсвинка имели защитный уровень вирусоспецифических антител против вирусов серотипов А и О.

Титры антител определенные в реакции нейтрализации против вируса типов А и О имели уровни ВНА ниже защитного.

Таблица 16 – Результаты исследований гуморального иммунитета у свиней на 14 сутки после вакцинации при подкожном введении эмульсионных вакцин

Характеристик вакцины	Значение титров вирусоспецифических антител против ВЯ в ИФА (log ₂)		Значение титров ВНА против ВЯ в РН (log ₂)	
	A2155	O2212	A2155	O2212
№1 Эм. ISA-206 п/к – 0,5см ³	<5,0	<5,0	2,50	1,50
	<5,0	5,0	4,50	1,50
	5,0	5,0	4,50	1,75
	<5,0	6,0	4,75	2,25
	<5,0	<5,0	4,75	1,50
К-во защищенных	1/5	3/5	4,10±1,18 (0/5)	1,70±0,33 (0/5)
№2 Эм. ISA-207 п/к – 0,5см ³	<5,0	5,0	2,50	2,50
	<5,0	6,0	2,25	2,00
	<5,0	<5,0	1,75	1,50
	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	2,0	1,75
К-во защищенных	0/5	2/5	2,00±0,46 (0/5)	1,85±0,48 (0/5)
№3 Эм. ISA-50 п/к – 0,5см ³	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	5,58	7,0	3,20	1,75
	<5,0	<5,0	3,50	1,50
	5,0	5,0	1,50	1,50
К-во защищенных	2/5	2/5	2,05±1,10 (0/5)	1,55±0,11 (0/5)
№4 Эм. “ВНИИЗЖ” п/к – 0,5см ³	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	2,00	1,75
	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	1,50	1,50
	<5,0	<5,0	1,50	3,00
К-во защищенных	0/5	0/5	1,60±0,22 (0/5)	1,55±0,11 (0/5)

Примечание: числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител, знаменатель - общее количество животных в опыте.

После вакцинации пяти животных образцом №4, не установили защитного уровня вирусоспецифических антител как ЖБ ИФА так и в рН.

Лучшим стимулирующим действием обладали адъюванты Montanide ISA-206, ISA-207 при подкожном введении.

Из адъювантов Montanide ISA-50 и адъюванта “ВНИИЗЖ” первый индуцировал больший уровень антител как при внутримышечном так и подкожном введении.

После отбора образцов крови через 14 ДПВ, провели ревакцинацию животных в аналогичных дозах и теми же способами введения. Через 14 суток после ревакцинации (28 суток) отобрали пробы крови и определяли титры вирусоспецифических антител в реакциях ЖБ ИФА и РН.

Результаты исследований отражены в таблицах 17 и 18.

Анализ данных таблицы 17 дает основания заключить, что повторная инъекция вакцин увеличили уровни вирусоспецифических антител во всех группах подсвинков взятых в опыт как методом ЖБ ИФА так и в реакции нейтрализации, однако корреляция между методами определения вирусоспецифических антител прослеживается только в группах животных, получивших вакцины №1 и №2.

С помощью ЖБ ИФА защитные уровни вирусоспецифических антител были определены во всех группах свиней, независимо от использованного адъюванта при внутримышечной инъекции вакцин.

Чувствительность метода определения антител ЖБ ИФА была выше, чем в реакции нейтрализации.

Группы животных, привитых эмульсионными вакцинами со сложным типом эмульсии «В-М-В» адъюванты ISA-206, ISA-207, которым препарат вводили внутримышечно показали наилучшие уровни антител. Защитные титры 5,0 и более $\log_2$ были определены у всех животных как против вируса типа А так и против вируса типа О.

Однако, в РН защитные уровни ВНА были установлены у 65% животных против типа А и 35% против типа О.

Таблица 17 – Результаты исследований в РН и ИФА сывороток крови свиней через 14 суток после ревакцинации при внутримышечной инъекции вакцин

Характеристика вакцины	Значение титров вирусоспецифических антител против ВЯ в ИФА ($\log_2$)		Значение титров ВНА против ВЯ в РН ($\log_2$)	
	A2155	O2212	A2155	O2212
№1 Эм. ISA-206 в/м – 1+1см ³	7,0	8,0	6,00	3,00
	7,0	8,0	5,50	4,00
	8,0	8,0	6,00	6,25
	7,58	8,0	5,50	7,00
	7,0	7,58	2,50	4,00
К-во защищенных	7,32±0,46 (5/5)	7,92±0,19 (5/5)	5,10±1,47 (4/5)	4,85±1,69 (2/5)
№2 Эм. ISA-207 в/м – 1+1см ³	7,0	8,0	5,75	4,75
	7,0	8,0	6,50	3,25
	8,0	8,0	6,50	5,50
	8,0	8,0	6,50	6,25
	8,0	8,0	4,50	5,50
К-во защищенных	7,60±0,55 (5/5)	8,0 (5/5)	5,95±0,87 (4/5)	5,05±1,13 (3/5)
№3 Эм. ISA-50 в/м – 1+1см ³	6,0	7,0	4,50	3,00
	8,0	8,0	5,50	2,25
	8,0	7,58	5,50	2,75
	5,0	7,0	2,50	3,00
	7,0	8,0	5,25	3,75
К-во защищенных	6,80±1,38 (5/5)	7,52±0,50 (5/5)	5,19±1,27 (3/5)	2,24±0,38 (0/5)
№4 Эм. “ВНИИЗЖ” в/м – 1+1см ³	6,0	7,0	3,25	2,50
	<5,0	5,58	3,50	2,50
	5,0	8,0	2,50	2,50
	6,0	7,0	5,00	5,00
	7,0	8,0	5,50	5,00
К-во защищенных	6,00±0,82 (4/5)	7,12±0,99 (5/5)	3,65±1,11 (2/5)	2,50±0,0 (2/5)

Примечание: числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител, знаменатель - общее количество животных в опыте.

Иные результаты были получены, когда вакцинацию проводили поочередным способом, данные отражены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты исследований сыворотки крови свиней методом ЖБ ИФА и РН при подкожном введения препаратов

Характеристик вакцины	Значение титров вирусоспецифических антител против ВЯ в ИФА (log ₂)		Значение титров ВНА против ВЯ в РН (log ₂)	
	A2155	O2212	A2155	O2212
№1 Эм. ISA-206 п/к – 0,5+0,5см ³	<5,0	<5,0	2,50	2,50
	<5,0	<5,0	2,50	2,50
	8,0	8,0	6,50	4,75
	5,0	5,58	2,50	3,00
	<5,0	5,58	2,50	2,50
К-во защищенных	2/5	6,39±1,40 (3/5)	3,30±0,8 (1/5)	3,05±0,97 (0/5)
№2 Эм. ISA-207 п/к – 0,5+0,5см ³	7,0	8,0	4,50	4,00
	6,0	7,0	5,00	4,00
	<5,0	5,0	2,50	2,50
	<5,0	6,0	2,50	4,00
	-	-	-	-
К-во защищенных	2/4	6,5±1,29 (3/4)	3,63±1,31 (1/4)	3,63±0,75 (0/4)
№3 Эм. ISA-50 п/к – 0,5+0,5см ³	5,0	7,0	5,25	5,00
	<5,0	<5,0	2,50	2,50
	7,0	8,0	5,50	2,75
	<5,0	5,0	2,50	4,00
	<5,0	7,0	2,75	3,00
К-во защищенных	2/5	6,75±1,26 (4/5)	3,70±0,69 (2/5)	3,45±0,83 (1/5)
№4 Эм. “ВНИИЗЖ” п/к – 0,5+0,5см ³	7,0	7,0	5,00	2,50
	5,0	6,0	2,75	2,50
	6,0	8,0	2,50	5,25
	6,0	7,0	3,00	3,25
	<5,0	<5,0	2,50	2,50
К-во защищенных	6,00±0,82 (4/5)	7,00±0,82 (4/5)	3,15±0,46 (1/5)	3,25±0,85 (1/5)

Анализ данных таблицы 18 показал, что защитные уровни антител при подкожном введении были установлены в реакции ЖБ ИФА у 52% особей против типа

А и 74% против типа О. У этих же подсвинков методом РН установили защитные титры ВНА у 26% вакцинированных против типа А и 10% против типа О.

Результаты таблицы 18 дают основания заключить, что повторная инъекция вакцины увеличила уровни вирусоспецифических антител во всех группах подсвинков в опыте. Лучшим способом введения является внутримышечный для всех препаратов содержащих Montanide ISA-206, 207 и ISA-50, однако с использованием адьюванта ФГБУ “ВНИИЗЖ” стимулирующая активность вакцины была одинаковой как при внутримышечном так и подкожном способе введения.

На 28 сутки после вакцинации у животных провели обор крови во всех четырех группах и двух контрольных, затем заразили адаптированным к свиньям афтозным вирусом О№2215/Приморский/2014 под слизистую языка в дозе 10^4 ИД₅₀ в 0,2 см³. Патологоанатомический осмотр провели на 8 сутки после заражения. Результаты контрольного заражения представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Сравнительные данные активности вакцин серологическими методами и контрольным заражением

Характеристика вакцины	Способ инъекции	Методы исследований		
		жб ИФА	РН	Контрольное заражение
№1 Эм. ISA-206	в/м	5/5	4/5	5/5
	п/к	3/5	1/5	4/5
№2 Эм. ISA-207	в/м	5/5	4/5	5/5
	п/к	3/4	0/4	3/4
№3 Эм. ISA-50	в/м	5/5	3/5	5/5
	п/к	4/5	0/5	4/5
№4 Эм.Адьювант “ВНИИЗЖ”	в/м	5/5	0/5	4/5
	п/к	4/5	0/5	4/5
Всего		34/39(87%)	9/39 (10,3%)	34/39 (87%)

Примечание: числитель количества защищенных животных; знаменатель количества вакцинированных животных.

Данные, представленные в таблице 19 показали, что количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител, определенных методом ЖБ ИФА соответствует количеству подсвинков защищенных от генерализации, после контрольного заражения адаптированным к свиньям гомологичным вирусом типа О. Результаты уровней ВНА, определенные в классической реакции нейтрализации соответствовали 10,3 % от числа вакцинированных. Защитными уровнями в ЖБ ИФА и в РН считали $5,0 \log_2$.

Были продолжены исследования сывороток от животных, вакцинированных опытными образцами препаратов в реакции ЖБ ИФА с использованием тест-систем фирмы PrioCHECK (Нидерланды – Швеция) и ФГБУ «ВНИИЗЖ». Работу проводили с образцами сывороток, полученных через 14 дней после вакцинации. Результаты отображены в таблице 19А.

Анализ данных таблицы 19А показал, что в результате исследований сывороток крови свиней в одном разведении с наборами PrioCHECK на 14-е сутки после иммунизации было выявлено по типу А - 3 из 40 (7,5%) животных с защитными уровнями антител, а по типу О 18 из 40 (46,15%) от количества вакцинированных. С помощью набора ФГБУ «ВНИИЗЖ» было обнаружено 14 из 40 (35,9%) свиней с защитным уровнем антител против вируса типа А и 22 из 40 (55%) против вируса типа О. Используя набор ФГБУ «ВНИИЗЖ», выявили 59,97% животных, вакцинированных препаратами с эмульсией «В-М-В» с защитным уровнем антител против 30,58%, обнаруженных с помощью набора PrioCHECK

Способ введения вакцины оказывал влияние на индукцию вирусоспецифических антител. При внутримышечном введении препарата на 14 сутки после вакцинации у 25 из 40 (62,5%) свиней были определены защитные уровни антител с помощью набора ФГБУ «ВНИИЗЖ» и только у 15 из 40 (37,5%) свиней с тест-системой PrioCHECK. Подкожный способ инъекции показал более низкий уровень вирусоспецифических антител при использовании наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ» и PrioCHECK- 11 из 40 (27,5%) и 6 из 40 (15%), соответственно.

Таблица 19^А – Количество положительных сывороток крови свиней с защитными титрами, определенными в ИФА, иммунизированных внутримышечно и подкожно эмульсионными вакцинами с различными адьювантами

Х-ка вакцины	ИФА с PrioCHECK К-во положительных сывороток		ИФА с ФГБУ «ВНИИЗЖ» К-во положительных сывороток	
	Тип А	Тип О	Тип А	Тип О
ISA-206 в/м – 1см ³	0/5	4/5	3/4	4/5
ISA-206 п/к - 0,5см ³	0/5	2/5	1/5	3/5
ISA-207 в/м - 1см ³	1/5	4/5	4/5	5/5
ISA-207 в/м – 0,5см ³	0/4	1/4	1/4	2/4
ISA-50 в/м 1см ³	2/5	3/5	3/5	5/5
ISA-50 в/м 0,5см ³	0/5	3/5	1/5	2/5
Адьювант «ВНИИЗЖ» в/м – 1см ³	0/5	1/5	1/5	1/5
Адьювант «ВНИИЗЖ» в/м – 0,5см ³	0/5	0/5	0/5	0/5
Общее к-во защищенных животных	3/39 (7,7%)	18/39 (46,15%)	14/39 (35,9%)	20/39 (51,28%)
Общее к-во защищенных «В-М-В»	1/39 (2,56%)	11/39 (28,2%)	9,39 (23,07%)	14/39 (35,9%)
Общее к-во защищенных «В-М»	2/39 (5,12%)	7/39 (17,39%)	5/39 (12,82%)	8/39 (20,51%)
Общее к-во защищенных при внутримышечном введении	0/39 (0%)	12/39 (30,77%)	11/39 (28,2%)	13/39 (33,33%)
Общее к-во защищенных при подкожном введении	0/39 (0%)	6/39 (15,38%)	3/39 (7,69%)	8/39 (20,51%)

С учетом полученных результатов в последующих опытах использовали тест-систему ЖБ ИФА «ВНИИЗЖ» для определения титров антител у вакцинированных животных.

3.5 Изучение гуморального и протективного иммунитета у свиней, вакцинированных производственной серией вакцины

В следующих опытах исследовали протективную активность производственной серии эмульсионной бивалентной вакцины №141020 методом контрольного заражения и уровень гуморального иммунитета серологическими методами.

Сравнили результаты по оценке гуморального и протективного иммунитета при внутримышечном и подкожном введении противоящурной эмульсионной вакцины в дозе 2 см^3 . Для изготовления эмульсионной вакцины использовали Montanide ISA – 206 в соотношении 1:1 с водным бивалентным антигеном А/Забайкальский/2013 и О/Приморский/2014. По истечении 14 и 21 СПВ проводили отбор крови для определения уровней вирусоспецифических антител. Иммуногенную активность вакцины определяли количественным методом на 21 СПВ.

Результаты исследований отражены в таблицах 20, 21, 22, 23.

Из данных таблицы 20 видно, что средние значения титров вирусоспецифических антител в сыворотках свиней группы “А” привитых цельной вакциной внутримышечно через 14 СПВ были $3,15 \pm 0,70$ в $\log_2$ и отсутствовали защитные уровни у животных определенных в РН. При исследовании этих образцов в ИФА защитный уровень антител установили у двух подсвинков. Через 21 СПВ титры ВНА против вируса типа А у подсвинков этой группы при определении в РН увеличились до $5,58 \pm 0,65 \log_2$ и все подсвинки имели защитные титры ВНА. У животных привитых разведенной вакциной в 5 или в 25 раз, защитный уровень вирусоспецифических антител в реакции нейтрализации не обнаружили, тогда как в ИФА через 21 СПВ три и два подсвинка имели защитный уровень антител соответственно.

Защитные уровни титров вирусоспецифических антител в группе подсвинков привитых цельной вакциной определенных ЖБ ИФА через 14 СПВ против вируса типа А были у двух особей, а через 21 СПВ четыре подсвинок, имел защитный уровень

вирусоспецифических антител. Иммуногенная активность была 11,18 ПД₅₀ в 2 см³ препарата.

Таблица 20. – Результаты исследований сыворотки крови в реакции нейтрализации и ИФА от животных, вакцинированных внутримышечно эмульсионной вакциной серии №141020 из штаммов А/Забайкальский/2013 и О2215/Приморский/14. Результаты контрольного заражения по типу А

Разведение вакцины	№ животного	Титры антител РН, против А		Титры антител против вируса ящура А в ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)		Результаты контрольного заражения А/Забайкальский/2013		
		14 СПВ	21 СПВ	14 СПВ	21 СПВ	Наличие генер.	ПД ₅₀ по ИФА	ПД ₅₀
		Тип А		Тип А			8,1	11,18
без разведения	1	3,00	5,75	3,58	5,0	-		
	2	3,75	5,25	5,58	6,0	-		
	3	2,50	5,25	2,58	4,0	-		
	4	2,50	6,50	3,58	5,0	-		
	5	4,00	6,50	5,58	5,58	-		
Кол-во защищ.		3,15±0,70 (0/5)	5,58±0,65 (5/5)	4,18±1,34 (2/5)	5,12±0,75 (4/5)	0/5		
1/5	6	2,50	2,75	3,0	3,0	+		
	7	2,00	3,50	2,58	2,58	+		
	8	2,50	4,00	4,0	5,58	-		
	9	3,25	4,75	5,0	4,58	-		
	10	3,75	5,25	4,0	4,0	-		
Кол-во защищ.		3,10±1,0 (0/5)	4,05±1,04 (1/5)	3,72±0,95 (1/5)	3,95±1,21 (2/5)	2/5		
1/25	11	2,75	2,50	2,58	2,58	+		
	12	2,50	2,75	2,58	2,58	+		
	13	2,50	3,50	2,58	5,58	-		
	14	2,50	3,50	2,58	5,58	-		
	15	2,50	2,75	4,0	5,0	+		
Кол-во защищ.		2,55±0,14 (0/5)	3,00±1,23 (0/5) 3ПД ₅₀	2,86±0,64 (0/5)	4,26±1,56 (3/5) 8,1ПД ₅₀	3/5		

Примечание: «н/и» - не исследовали; «+» - наличие процесса генерализации ящура; «-» - отсутствие генерализации ящура; числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител; знаменатель - общее количество животных в опыте.

Если же в формулу Кербера для расчета иммуногенности внести значения защитных титров вирусоспецифических антител определенных в ЖБ ИФА, то ПД₅₀ при внутримышечном введении равно 8,1ПД₅₀ в прививной дозе.

Таблица 21 – Результаты исследований сыворотки крови в реакции нейтрализации и ИФА от животных, вакцинированных подкожно противоящурной эмульсионной вакциной серии №141020 и контрольном заражении вирусом типа А

Разведение вакцины	№ животного	Титры антител РН, против А		Титры антитела против вируса ящура типа А в ИФА (ВНИИЗЖ)		Результаты контрольного заражения тип А/Забайкальский/2013		
		14 СПВ	21 СПВ	14 СПВ	21 СПВ	Наличие генер.	ПД ₅₀ ИФА	ПД ₅₀
		Тип А		Тип А			8,1	11,18
без разведения	16	2,75	6,50	3,58	5,0	-		
	17	3,75	6,00	5,58	6,0	-		
	18	3,50	6,25	2,58	5,0	-		
	19	2,50	5,25	3,58	5,0	-		
	20	4,00	5,50	5,58	5,58	-		
К-во защищ.		3,30±0,75 (0/5)	5,95±0,8 (5/5)	4,18±1,34 (2/5)	5,32±0,4 6 (5/5)	0/5		
1/5	21	3,50	5,25	3,0	5,0	-		
	22	3,25	4,00	2,58	4,0	+		
	23	2,50	3,25	<2,58	4,0	+		
	24	2,50	5,00	5,0	5,0	-		
	25	2,00	3,75	4,0	4,0	-		
К-во защищ.		3,10±0,57 (0/5)	4,4±0,67 (2/5)	3,65±1,08 (1/5)	4,40±0,5 5 (2/5)	2/5		
1/25	26	2,50	3,50	2,58	5,58	-		
	27	2,50	3,50	2,58	4,0	+		
	28	2,75	2,75	2,58	3,0	+		
	29	2,50	3,50	2,58	3,0	+		
	30	2,75	3,25	5,0	5,0	-		
К-во защищ.		2,60±0,14 (0/5)	3,75±0,33 (0/5) 4,3ПД ₅₀	3,06±1,08 (1/5)	4,12±1,1 7 (2/5) 8,1ПД ₅₀	3/5		
Контр. 1	61	н/и				+		
Контр. 2	62	н/и				+		

Примечание: «н/и» - не исследовали, «+» - наличие процесса генерализации ящура, «-» отсутствие генерализации ящура; числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител, знаменатель - общее количество животных в опыте.

Из данных таблицы 21 видно, что средние значения титров вирусоспецифических антител в сыворотках свиней группы “В” привитых цельной вакциной подкожно (животных 16-20) через 14 суток после вакцинации титры в РН составили $3,30 \pm 0,75$ и все пять животных не имели защитных титров вирусоспецифических антител. По данным ЖБ ИФА две головы животных из пяти имели защитный уровень вирусоспецифических антител против типа А. На 21 сутки после вакцинации средние значения титров вирусоспецифических антител увеличились на $2,75 \log_2$ и все животные имели защитный уровень вирусоспецифических антител против типа А относительно результатов через 14 суток после иммунизации.

Образцы сывороток от животных, привитых разведенной вакциной в 5 и 25 раз при исследовании в реакции нейтрализации не обнаружили защитного уровня антител, а в ЖБ ИФА по два подсвинка имели защитный уровень вирусоспецифических антител соответственно. Через 21 СПВ после контрольного заражения гомологичным вирусом типа А в группе, вакцинированных цельной вакциной были защищены от генерализации все пять привитых животных, в группах животных получивших дозу разведенной вакциной в 5 и 25 раз были защищены при внутримышечном так и подкожном способе введения препарата по три и две головы свиней соответственно. Иммуногенная активность вакцины по валентности типа А составила $11,18 \text{ ПД}_{50}$ в 2 см^3 вакцины.

Результаты исследований сывороток крови методом ЖБ ИФА и РН, а также результаты контрольного заражения вирусом типа О отражены в таблицах 22 и 23.

Из данных таблицы 22 видно, что средние значения титров ВНА в сыворотках крови свиней группы “А” привитых цельной вакциной внутримышечно (животные 1-5) через 14 суток после вакцинации установили в РН титры ВНА составили $3,65 \pm 0,65 \log_2$. По данным ЖБ ИФА четыре головы животных из пяти имели защитный уровень вирусоспецифических антител против типа О. У этих же животных на 21 сутки после вакцинации титры вирусоспецифических антител увеличились на $2,35$

log₂ относительно результатов через 14 СПВ. По результатам ЖБ ИФА через 21 день после вакцинации защитный титр вирусоспецифических антител имели пять исследованных животных из пяти вакцинированных.

Таблица 22. Результаты исследований сыворотки крови в РН и ИФА от животных, вакцинированных внутримышечно противоящурной эмульсионной вакциной серии №141020 из штаммов А/Забайкальский/2023 и О/Приморский/2014. Результаты контрольного заражения по типу О

Разведение вакцины	№ животного	Титры антител РН, против О		Титры антитела против вируса ящура типа О в ИФА (ВНИИЗЖ)		Результаты контрольного заражения тип О/Приморский/2014		
		14 СПВ	21 СПВ	14 СПВ	21 СПВ	Налич. генер.	ПД ₅₀ ИФА	ПД ₅₀
		Тип О		Тип О			21,28	29,28
без развед.	31	3,00	6,25	4,58	5,58	-		
	32	3,25	5,75	5,0	6,58	-		
	33	4,50	6,50	7,0	7,0	-		
	34	4,00	6,00	7,0	7,0	-		
	35	3,50	5,50	7,0	7,0	-		
К-во защищ.		3,65±0,65 (0/5)	6,0±0,4 (5/5)	6,12± 1,22 (3/5)	6,63±0,62 (5/5)	0/5		
1/5	36	3,00	5,25	5,0	5,58	-		
	37	3,00	4,00	4,0	4,0	-		
	38	3,50	5,25	7,0	7,0	-		
	39	3,50	4,75	5,0	6,0	-		
	40	3,75	5,50	5,58	7,0	-		
К-во защищ.		3,35±0,34 (0/5)	4,95±0,6 (3/5)	5,32±1,10 (2/5)	5,92±1,24 (4/5)	0/5		
1/25	41	3,00	3,00	4,58	5,0	-		
	42	2,50	3,00	2,58	3,0	+		
	43	2,50	3,25	4,58	4,58	+		
	44	2,50	4,00	5,0	6,0	-		
	45	2,50	2,50	4,58	5,0	-		
К-во защищ.		2,65±0,22 (0/5)	3,15±0,54 (0/5) 5,9ПД ₅₀	4,26±0,96 (1/5)	4,72±1,09 (3/5) 21,28ПД ₅₀	2/5		

Примечание: «н/и» - не исследовали, «+» - наличие процесса генерализации ящура, «-» - отсутствие генерализации ящура; числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител, знаменатель - общее количество животных в опыте.

Животные, которых вакцинировали внутримышечно дозой 0,4 см³ и 0,08 см³, имели титры ВНА через 14 СПВ – $3,35 \pm 0,34$ и $2,65 \pm 0,22$, соответственно. Защитного уровня ВНА в крови животных в этот период не отмечалось.

К 21 СПВ уровень ВНА увеличился до $4,95 \pm 0,66$ и $3,15 \pm 0,54$ при исследовании в РН. Три из пяти вакцинированных дозой 0,4 см³ имели защитный уровень ВНА.

Результаты, полученные в ЖБ ИФА показали, что через 14 СПВ по четыре подсвинка, привитые 2 см³ препарата, и 0,4 см³ имели защитный титр вирусоспецифических антител и одно животное получившее дозу 0,08 см³. Через 21 СПВ исследованиями в ЖБ ИФА установили защитные уровни антител у пяти подсвинков, привитых полной дозой вакцины (2 см³) и у четырех привитых 0,4 см³, а также у двух получивших дозу 0,125 см³. При контрольном заражении гомологичным вирусом типа О были защищены по пять животных от генерализации получивших полную дозу и 0,4 см³ препарата и два подсвинка получивших 0,125 см³. Иммуногенная активность против вируса типа О составила 29,3 ПД₅₀, а иммуногенная активность, рассчитанная по значениям ЖБ ИФА, была при внутримышечном введении 21,28 ПД₅₀.

Аналогично оценивали результаты для группы животных “В”, которых иммунизировали подкожно (таблица 23).

Анализ результатов таблицы 23 показал, что три группы животных по пять голов, вакцинированных дозой 2 см³, 0,4 см³ и 0,125 см³ подкожно при исследовании через 14 СПВ в реакции нейтрализации не имели защитного уровня антител. Через 21 СПВ в этих же группах пять животных получивших дозу 2 см³ все имели защитный уровень иммунитета, установленный в РН, животных двух других групп защитного уровня ВНА против типа О не имели. Защитный уровень вирусоспецифических антител, установленный с помощью ЖБ ИФА через 14 СПВ имели четыре подсвинка вакцинированных 2 см³ препарата, три головы животных, получивших 0,4 см³ вакцины и четыре животных, привитых 0,08 см³.

Таблица 23 – Результаты исследований сывороток крови в РН и ЖБ ИФА от животных, вакцинированных подкожно противоящурной эмульсионной вакциной серии №141020 штаммов А/Забайкальский/2023 и О/Приморский/2014. Результаты контрольного заражения по типу О

Разведение вакцины	№ животного	Титры антител в РН, против О		Титры антитела против вируса ящура в ИФА (ВНИИЗЖ)		Результаты контрольного заражения тип О/Приморский/2014		
		14 СПВ	21 СПВ	14 СПВ	21 СПВ	Наличие генер.	ПД ₅₀ ИФА	ПД ₅₀
		Тип О		Тип О			29,3	21,28
без развед.	46	3,50	5,50	5,0	8,0	-		
	47	4,25	6,00	6,0	7,0	-		
	48	2,50	5,75	2,58	6,0	-		
	49	3,50	6,00	5,0	6,0	-		
	50	3,00	5,25	5,0	7,0	-		
M±m		3,35±0,65 (0/5)	5,7±0,33 (5/5)	4,72±1,27 (4/5)	6,80±0,84 (5/5)	0/5		
1/5	51	3,00	4,75	4,0	5,0	-		
	52	3,25	4,5	4,0	5,0	-		
	53	3,50	4,00	5,0	6,0	-		
	54	3,00	3,25	5,58	5,58	-		
	55	3,50	3,75	5,0	5,0	-		
M±m		3,25±0,25 (0/5)	4,05±0,6 (0/5)	4,72± 0,70 (3/5)	5,32±0,46 (5/5)	0/5		
1/25	56	2,50	3,50	5,0	5,58	-		
	57	2,25	2,50	2,58	4,58	+		
	58	2,50	3,00	5,58	7,0	+		
	59	2,25	3,00	5,58	4,58	-		
	60	3,00	3,25	6,58	5,58	+		
M±m		2,5±0,3 (0/5)	3,1±0,37 (0/5) 2,2ПД ₅₀	5,06±1,50 (3/5) 15,4ПД ₅₀	5,86±0,64 (3/5) 29,3ПД ₅₀	3/5		
Контр. 1	61	н/и				+		
Контр. 2	62	н/и				+		

Примечание: «н/и» - не исследовали; «+» - наличие процесса генерализации ящура; «-» - отсутствие генерализации ящура; числитель - количество животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител; знаменатель - общее количество животных в опыте.

Через 21 СПВ во всех трех группах у животных обнаружили защитные уровни вирусоспецифических антител.

После контрольного заражения гомологичным вирусом типа О были защищены от генерелизации по пять животных получивших дозу 2 см³ и 0,4 см³ и два подсвинка, привитых дозой 0,08 см³.

Иммуногенная активность вакцины против вируса типа О при внутримышечном введении была 29,3 ПД₅₀, а по результатам ИФА -21,28ПД₅₀, а при подкожном 21,28ПД₅₀ в дозе 2см³ и по результатам ИФА - 29,3 ПД₅₀ в дозе.

3.6 Определение антител к неструктурным белкам вируса ящура у вакцинированных свиней

Исследования проводили на 20 головах свиней, которые были иммунизированы цельной вакциной (2см³) в группах А и В (табл. 20, 21, 22, 23). Для определения титров антител к неструктурным белкам вируса ящура пробы крови отбирали до вакцинации и через 21 день после вакцинации. Полученные образцы сывороток исследовали с помощью блокирующего варианта иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями производителя.

Тестирование проводили с использованием тест-систем ИФА “PrioCHECK FMDVNSELISA” Нидерланды и ФГБУ “ВНИИЗЖ”

Для контрольных и исследуемых образцов после проведения реакции на спектрофотометре-ридере измеряли значение оптических плотностей (ОП) и преобразовывали их в процент ингибции, пользуясь формулой:

$$PJ = (1 - \frac{ОП_s}{ОП_{ко}}) \times 100, \text{ где}$$

PJ-процент ингибции (%)

ОП_s- оптическая плотность исследуемой сыворотки крови,

ОП_{ко}- оптическая плотность отрицательного контроля.

Сыворотки крови животных в отношении наличия антител к неструктурным белкам считали положительными, если значение $PJ \geq 50\%$. При этом значение оптической плотности отрицательного контроля должно быть $\geq 1,0$. Процент ингибиции слабоположительного контроля должен быть $> 70\%$ (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты исследований антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней

№ животного	Значение ОП о.е			Процент ингибиции Р76%		
	0 суток до вакцинации	ФГБУ “ВНИИЗЖ”	PrioCHECK	0 суток до вакцинации	ФГБУ “ВНИИЗЖ”	PrioCHECK
1	1,192	0,988	0,958	6,436	22,449	24,776
2	1,175	0,992	0,962	7,771	22,135	24,471
3	1,189	0,995	0,965	6,672	21,900	24,243
4	1,185	0,987	0,957	6,986	22,527	24,852
5	1,175	0,993	0,963	7,771	22,057	24,395
15	1,196	1,001	0,971	6,122	21,429	23,786
16	1,191	1,004	0,974	6,515	21,193	23,557
17	1,244	1,055	1,023	2,355	17,190	19,674
18	1,245	1,002	0,972	2,276	21,350	23,710
19	1,199	0,981	0,952	5,887	22,998	25,308
30	1,222	0,963	0,934	4,082	24,411	26,679
31	1,195	0,953	0,924	6,201	25,196	27,440
32	1,203	0,995	0,965	5,573	21,900	24,243
33	1,232	0,966	0,937	3,297	24,176	26,451
34	1,225	0,991	0,961	3,846	22,214	24,547
45	1,189	0,967	0,938	6,672	24,097	26,374
46	1,183	0,977	0,948	7,143	23,312	25,613
47	1,177	0,994	0,964	7,614	21,978	24,319
48	1,185	0,988	0,958	6,986	22,449	24,776
49	1,208	1,006	0,976	5,181	21,036	23,405
Отриц. контр.	1,274	1,274	1,274	0,000	0,000	0,000
Полож. контр.	0,209	0,209	0,209	83,595	83,595	83,595
Слабоположительный	0,544	0,544	0,544	57,300	57,300	57,300

Примечание: процент ингибиции исследуемой сыворотки менее 50% считается отрицательным (не индуцируется выработкой антител к неструктурным белкам вируса ящура).

Из результатов таблицы 24 видно, что все сыворотки, полученные от свиней до и после введения одной дозы вакцины, по данным ИФА имели процент ингибиции менее 50%. Противоящурная эмульсионная бивалентная вакцина серии №141020 из штаммов А/Забайкальский/2013 и О/Приморский/2014 вирус ящура не индуцирует выработку антител к неструктурным белкам как при внутримышечном так и при подкожном введении.

Обсуждение

Заболевание животных ящуром сопровождается большими потерями продукции животноводства, потерей рынков сбыта, нарушением хозяйственной деятельности. Ящур, как особо опасное заболевание, своим быстрым распространением среди восприимчивого поголовья способен вызывать социально -экономические потрясения [177].

В благополучных по ящуре странах всегда существуют риски заноса вируса на свою территорию из других эндемичных по ящуре государств [73, 10, 74, 88, 84, 133, 134].

Создание иммунной прослойки в популяции животных является основным фактором, предотвращающим распространение заболевания. Успех вакцинопрофилактики зависит от качества используемых вакцин.

Вакцины должны иметь высокую протективную активность, а используемые в вакцине штаммы должны соответствовать изолятам, циркулирующим на данной территории. Необходимо всегда учитывать высокую изменчивость вируса ящура, появление новых его вариантов [216, 10, 13, 147, 82].

Следовательно, различия в антигенном спектре возбудителей требуют соблюдения адекватного подбора включаемых в вакцину антигенов, поскольку только адекватные антигенные соответствия обеспечивают эффективную компанию по вакцинации [129].

Вакцинация остается наиболее эффективным фактором для купирования очагов ящура и снижения распространения вируса [197].

Оценка качества вакцин против ящура можно проводить в том числе с помощью реакции нейтрализации, которая демонстрирует связь между титром вирусоспецифических антител и уровнем защиты животных [142, 179, 143, 168, 205].

Согласно руководству ВОЗЖ защитным уровнем вирусоспецифических антител является 1,5 lg [167, 46]. Другие факторы могут влиять на эффективность вакцины против ящура, к примеру, соблюдение холодовой цепи в процессе транспортировки и хранения [107].

Эффективные вакцины должны индуцировать защитные уровни вирусоспецифических антител у 70-80% популяции. В наших исследованиях животные, у которых уровень вирусоспецифических антител был равен 1,5 lg, не заболевали генерализованной формой ящура при контрольном заражении гомологичным вирусом. Это согласуется с результатами других исследований [46].

В наших исследованиях чувствительность определения антител в ИФА была значительно выше, чем в РН. Сходные данные были отмечены Кременчугской С.Р., (2018), было отмечено, что чувствительность ИФА составила 97,4%, в РМН только 95% при 100% специфичности реакции.

Результаты проведенных нами опытов показали, что через 14 дней после вакцинации в сыворотках крови животных уровни вирусоспецифических антител определенные в ИФА и РН были очень противоречивы и не зависели от используемых адъювантов и способа введения.

Сравнительная оценка полученных результатов в ЖБ ИФА тест-системами ФГБУ “ВНИИЗЖ” и PrioCHECK показала, что тест-система ФГБУ “ВНИИЗЖ” выявила 35,9% защитного уровня вирусоспецифических антител против вируса типа А и 51,28% против вируса типа О, в этот же период с тест-системой PrioCHECK

установлено 7,7% животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител по типу А и 46,15% по типу О.

В зависимости от типа эмульсии в вакцине тест-системой ФГБУ “ВНИИЗЖ” было выявлено 59,97% вакцинированных с защитным уровнем вирусоспецифических антител против 30,58%, обнаруженных тест-системой Prio-CHECK.

Способ введения препарата оказывая влияние на индукции антител. При внутримышечном введении препарата 61,53% подсвинков были выявлены с защитным уровнем антител тест-системой ФГБУ “ВНИИЗЖ” и только 30,77% PrioCHECK.

Подкожный способ инъекции вакцин с помощью автоматического шприца показал более низкие результаты, соответственно, тест-система ФГБУ “ВНИИЗЖ” и PrioCHECK – 28,2% и 15,38% животных с защитными уровнями антител.

По нашему мнению увеличение чувствительности тест-системы ФГБУ “ВНИИЗЖ” произошло в результате того, что в набор входили гомологичные штаммы вирусов типов О и А, используемые для изготовления вакцины. Более определенными получили результаты после двукратной вакцинации с интервалом в 14 дней (28 ДПВ).

Чувствительность метода определения антител ЖБ ИФА была выше, чем в реакции нейтрализации. В группах животных, привитых эмульсионными вакцинами со сложным типом эмульсии “В-М-В”, с внутримышечным введением препарата, в ЖБ ИФА определили у 100% особей защитные уровни антител против серотипов А и О. Однако в РН защитные уровни антител были установлены у 80% подсвинков против типа А и у 70% против типа О.

При подкожном способе введения препаратов защитные уровни в ЖБ ИФА установили против типа А у 44,0% животных и у 66,7% против типа О. У этих же подсвинков в РН у 22% установили защитные уровни вирусоспецифических антител против типа А, а против вируса типа О титры антител были меньше $5,0 \log_2$.

Результаты, полученные при контрольном заражении через 28 ДПВ показали, что вакцины изготовленные с адъювантами Montonide ISA-206 и 207 защитили всех

привитых животных при внутримышечном введении, однако эти же вакцины введенные подкожно индуцировали защитные уровень иммунитета только у 77,8% вакцинированных.

Эмульсионные вакцины с типом эмульсии «вода в масле» при внутримышечном введении защитили 90% привитых, а при подкожном введении только - 80%.

Иммуногенную активность вакцин в настоящее время определяют, как методом заражения активным вирусом так и серологическим методом, так как защита от заболевания ящуром связана с количеством гуморальных антител, индуцированных вакцинами. Следовательно, реакция нейтрализации, ЖБ ИФА можно использовать для оценки качества вакцин и эффективности [167,16,50].

Многие исследователи посвятили свою деятельность разработке методов оценки активности вакцины без использования контрольного заражения естественно восприимчивых животных. По мнению других ученых [100], что минимальный титр в ЖБ ИФА, соответствующий защитному титру в сыворотке крови КРС является титр $2,1 \lg$, тогда как в РН он равен $1,8 \lg$.

Метод определения $ПД_{50}$ *in vivo* является более точным, однако риски связанные с использованием активного вируса и его дороговизна вынуждают ученых искать альтернативные способы оценки иммуногенной активности препаратов.

Cloeta M с сотр. [131] считали, что при серологической оценке как в РМН, так и в ЖБ ИФА пограничным значением титров антител является разведение сыворотки 1:45 ($1,6 \lg$).

Мы оценивали наши защитные уровни вирусоспецифических антител в разведении 1:32 ($1,5 \lg$), они согласуются с результатами А.М. Рахманова с соавтор. [46].

В. Robiolo et al, отметили, что установили корреляцию между защитой и серологическим титром вирусоспецифических антител при контрольном заражении КРС через 90 ДПВ, в ЖБ ИФА равном $>2,1 \lg$ и $> 2,2 \lg$ [189].

Китайские ученые исследовали сыворотки крови от свиней, вакцинированных через 28 ДПВ в ЖБ ИФА, считают защитным титр более и равном 1:64 [217].

Широкое распространение ящура тесно связано с особенностями возбудителя, наличие семи антигенно различных серотипов, которые индуцируют иммунитет ограниченной специфичности, высокой контагиозностью инфекции, наличием продолжительного вирусоносительства, тесных межгосударственных связей.

Высокая контагиозность вируса ящура, а также характерная множественная вариабельность значительно затрудняет меры профилактики и борьбы, диктуя совершенствование средств борьбы и диагностики заболевания.

Поскольку все серологические методы основаны на взаимодействии антител с антигенами, основное значение при усовершенствовании тест-систем имеет получение высокоспецифических препаратов антиген/антитело.

Для получения высокоочищенных препаратов 146S компонента вируса ящура нами разработаны «Методические указания получения антител для тест-систем ЖБ ИФА». Была разработана схема иммунизации высокоочищенным 146S антигеном лабораторных животных для получения высокоспецифических сывороток. Серологические тесты должны демонстрировать эффективность применения вакцин.

РН и РМН достаточно трудоемкие методы и могут использоваться только при наличии условий работы с вирулентными штаммами.

По нашему мнению, при оценке чувствительности метода оптимальным является сравнение результатов полученных РН и ЖБ ИФА.

В наших опытах полученные результаты в ИФА и РН были трудно сопоставимы, однако показатели ЖБ ИФА достаточно хорошо выявляли защитные уровни вирусоспецифических антител, особенно при двукратном введении вакцины.

Мы руководствовались диагностическим порогом для тест-систем ЖБ ИФА и РН - 1,5 lg SN₅₀.

По мнению многих исследователей результаты полученные с помощью ЖБ ИФА наиболее сопоставимы с результатами РН, как наиболее объективного теста для оценки уровня вирусоспецифических антител.

Главной целью тест-систем по определению вирусоспецифических антител является достижение корреляции результатов серологических тестов и контрольного заражения.

Покупатели препаратов против ящура должны исследовать активность приобретенных вакцин перед применением. Многие лаборатории в мире не могут работать с активным вирусом ящура в силу отсутствия условий биологической безопасности помещений, поэтому ИФА будет являться инструментом для оценки иммуногенности приобретенных вакцин, поскольку для постановки ИФА не требуются специальные безопасные помещения, так как не требуется использование активных штаммов вируса ящура.

Метод ИФА дает возможность с минимальными финансовыми затратами в короткие сроки привести оценку иммуногенной активности приобретенных препаратов [1; 3].

Нами была проведена работа по сравнительному изучению титров вирусоспецифических антител серологических тестов и контрольного заражения.

Активность вакцины определяли на подсвинках массой 30-50 кг путем установления количества защитных доз РД₅₀ по методу Кербера.

Полученные результаты позволяют рекомендовать метод ИФА для оценки активности вакцин против ящура при входном контроле перед компанией вакцинации в практических условиях.

При расчете активности коммерческой эмульсионной вакцины серии №141020 по методу Кербера мы получили следующие результаты: при внутримышечной

инъекции препарата в прививном объеме 2 см³ содержалось 11,18 ПД₅₀ по типу А (результаты таблицы 10).

Если в формулу Кербера внести данные полученные в ЖБ ИФА, получим активность вакцины по типу А равную 8,1 ПД₅₀ в дозе 2 см³ при внутримышечном и подкожном способах введения препарата. Так же можно поступить и с результатами полученными в реакции нейтрализации с сыворотками отобранными на 21 ДПВ. Результат, который мы получили равен 3 ПД₅₀ в прививном объеме. Это значит, что используя серологические методы определения гуморального иммунитета можно рассчитать активность препарата и выразить ее в количестве протективных доз.

Используя этот же метод расчета при введении препарата подкожно, с помощью автоматического инъектора получили активность вакцины по валентности А по результатам ЖБ ИФА и РН равную 4,3 ПД₅₀ и 8,1 ПД₅₀ в прививной дозе. Результаты близки к значениям, полученным при введении препарата внутримышечно (таблицы 20, 21, 22, 23).

Сравнение полученных результатов с итоговыми данными при контрольном заражении не выявили существенных расхождений, особенно с данными полученными в ЖБ ИФА.

Анализ результатов полученных серологическими методами по валентности типа О показал, что активность вакцины через 21 ДПВ составила по результатам ИФА - 21,28 ПД₅₀ по данным ИФА если вакцину вводили внутримышечно (таблица 12).

При подкожной инъекции препарата активность вакцины по валентности типа О через 21 ДПВ составила по результатам ИФА - 29,3 ПД₅₀ в прививной дозе (таблица 13).

Данные полученные в ИФА наиболее близки данным, полученным в остром опыте.

Поэтому мы считаем, что ЖБ ИФА можно рекомендовать как альтернативный метод оценки активности эмульсионных вакцин без использования контрольного

заражения. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод ИФА для оценки активности вакцин против ящура.

Потребители эмульсионных препаратов против ящура могут определять активность препаратов при входном контроле с помощью тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» гомологичного сеортипа в обычных лабораторных условиях.

Разработанная тест-система на основе жидкофазного блокирующего варианта ИФА для определения антител к структурным белкам вируса ящура тест-систем О №2212/Приморский/2014» и штамма «А №2155/Забайкальский/2013» является специфичной и чувствительной. Уникальность тест-системы состоит в 100%-й степени гомологии с вакцинными продуктами, что позволяет максимально достоверно и эффективно оценивать антигенные и иммуногенные свойства противоящурной вакцины после введения животным при её производстве и последующем применении. При испытаниях данная тест-система характеризовалась высокими значениями диагностической чувствительности, диагностической специфичности, диагностической точности, что определяло высокую степень согласованности результатов реакции ИФА с известным диагностическим статусом обследуемых животных.

Таким образом, иммуноферментная тест-система для оценки гуморального иммунитета против ящура генотипов А/ASIA/SEA-97 и О/SEA/Mya-98, имеющая высокую степень гомологии с вакцинными штаммами, обладающая высокими диагностическими показателями, является незаменимым инструментом оценки качества вакцины в ИФА. Особенно важным это является для контроля эффективности вакцины, предназначенной для применения в странах, где циркулировали генетически близкие к вакцинным штаммам изоляты вируса ящура серотипов А и О генотипов А/ASIA/SEA-97 и О/SEA/Mya-98.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Итоги исследований

1. Установлено, что режим инаktivации вируса ящура типов А и О в течение 24 часов с помощью 0,003 М БЭИ при рН 7,2-7,8 и температуре $37,0 \pm 0,1$ °С снижает количество 146S компонента на 8,16% и 6,01%, соответственно. В то же время при аналогичных условиях инаktivации с 0,03% 1,2-АЭЭИ происходит снижение 146S компонента для типа О на 9,7 %, а для типа А на 10,97%.

2. Установлено, что полигексаметиленгуанидин гидрохлорид в концентрациях 0,005, 0,007, 0,01% при очистке культуральной вирусосодержащей суспензии снижает количество 146S компонента на 4,6; 6,0 и 20,0 %, соответственно.

3. Разработана эффективная схема подготовки антигена для иммунизации животных, включающая ультрафильтрацию, очистку флокулянтами и преципитацию полиэтиленгликолем, позволяющая получить с максимальным сохранением 146S компонента высокоиммуногенный материал, необходимый для индукции специфических антител высокой авидности к ключевым эпитопам вируса ящура.

4. Установлено, что в разработанных тест-системах оптимальные рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» сенсibilизирующих и детекторных антител составили 1:3000, 1:9000, 1:4000, а для штамма «О №2212/Приморский/2014» – 1:3500, 1:9000, 1:4500, соответственно.

5. Разработаны тест-системы на основе ЖБ ИФА с применением антигена вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014» и создан набор для определения гуморального иммунитета у вакцинированных животных и контроля эффективности вакцин против ящура.

6. Определены валидационные характеристики тест-систем на основе полученных иммуноспецифических компонентов вируса ящура типов А и О в 95 %-ном доверительном интервале, а именно, для типа А диагностическая чувствительность – 98,55%, диагностическая специфичность – 97,63%, для типа О

диагностическая чувствительность – 98,44%, диагностическая специфичность – 97,53%.

7. Тест-система ФГБУ «ВНИИЗЖ» по сравнению с набором PrioСНЕК показала более высокую диагностическую чувствительность, так как выявляла через 14 дней после вакцинации по типу А – 35,9% и по типу О – 51,28% животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител от количества вакцинированных животных, тогда как в тест-системе PrioСНЕК – 4,7% животных были с защитным уровнем вирусоспецифических антител по типу А и 46,15% – по типу О.

8. В экспериментах по оценке гуморального и протективного иммунитета у свиней, привитых эмульсионными противоящурными вакцинами, было показано, что уровни титров антител, определенных в реакции нейтрализации и ЖБ ИФА, коррелировали с результатами контрольного заражения и не зависели от способа введения вакцины и применяемого адъюванта.

4.2 Практические предложения

Разработаны и внедрены в лабораторную практику:

- «Методические рекомендации по определению флоккулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)»;
- «Набор для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе», СТО 00495527-0407-2022;
- «Методические рекомендации по концентрированию антигена вируса ящура с помощью тангенциальной фильтрационной установки».
- Промышленный Регламент на «Производство набора для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе».

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Использование результатов данной работы и дальнейшее совершенствование диагностических систем необходимо при проведении мониторинговых исследований, определении эффективности вакцинопрофилактики и контроле качества культуральных инактивированных противоящурных вакцин.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ - антиген

АЭЭИ - аминоксилэтиленимин

БЭИ - бинарный этиленимин

ВНА - вируснейтрализующие антитела

«В-М-В» - вода-масло-вода

ВОЗЖ - Всемирная организация по охране здоровья животных

ГОА - гель гидроокиси алюминия

ДПВ - день после вакцинации

ДСН - додецилсульфат натрия

ЖБ ИФА - жидкофазный блокирующий иммуноферментный анализ

ИД₅₀ - 50% инфекционная доза

ИмД₅₀ - 50% иммунизирующая доза

ИФА - иммуноферментный анализ

КА - контроль антигена

КББ - карбонатно-бикарбонатный буфер

КК - контроль конъюгата

КРС - крупный рогатый скот

ОП - оптическая плотность

ПД₅₀ - 50% протективная доза

ПГМГ - полигексаметиленгуанидин

РМН - реакция микронейтрализации

РН - реакция нейтрализации

РРИД - реакция радиальной иммунодиффузии

РУСК - реакция угнетения связывания компонента

СП - культура клеток почки свиньи

СПВ - сутки после вакцинации

ТЦД₅₀ - 50% тканевая цитопатическая доза

ФБР - фосфатно-буферный раствор

ФГБУ "ВНИИЗЖ" - Федеральное государственное бюджетное учреждение
"Федеральный центр охраны здоровья животных"

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтернативные методы оценки иммуногенной активности универсальных (эмульсионных) противоящурных вакцин / Б. А. Кругликов, Е. П. Салашов, Т. Я. Тарасенко [и др.] // Ветеринария. — 1999. — № 12. — С. 22.
2. Аминоэтилэтиленмин – средство инаktivации инфекционности вируса ящура / Н. А. Улупов, В. В. Михалишин, А. А. Гусев [и др.] // Современные аспекты ветеринарной патологии животных : материалы конференции, посвященной 40-летию со дня основания ВНИИЗЖ (23–25 ноября 1998 г.). — Владимир, 1998. — С. 53–62.
3. Антигензависимая активация лимфоидных клеток и гуморальный иммунный ответ лабораторных животных на антигены вируса ящура / М. Г. Рахмангулов, В. Ю. Кулаков, И. В. Давыдов [и др.] // Вирусы и микробн. бол. ж-ных : сборник научных трудов. — Владимир, 1995. — С. 77-81.
4. Антигенная вариабельность вируса ящура серотипа А и обоснование необходимости получения новых актуальных производственных штаммов / Р. Н. Мельник, Н. В. Хаустова, Н. В. Мельник [и др.] // Ветеринария и кормление. — 2019. — № 3. — С. 29-31. — DOI: 10.30917/АГТ-VK-1814-9588-2019-3-8.
5. Антикоррозийные свойства обеззараживающих реагентов на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида / И. И. Воинцева, Т. Ю. Нижник, Т. В. Стрикаленко, [и др.] // Вода: химия и экология. — 2018. — № 10–12(117). — С. 99–108.
6. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, Т. Л. Воробьев. — Ленинград : Медгиз, 1962. — 180 с. — Текст : непосредственный.
7. Вакцина инаktivированная эмульсионная против ящура типа О/ Д.А. Лозовой, Д.В. Михалишин, В.А. Стариков [и др.] // Пат. 2665849 РФ. МПКС 12№7/00 заяв. 15.12.17:опубл. 4.09.18:Бюл №25
8. Вакуленко, В. В. Способ защиты картофеля и овощей при хранении : патент № 2048721 Российская Федерация : МПК А01N 47/44, А01С 1/00, А01N 57/20, А01Р 15/00 / В. В. Вакуленко, П. А. Гембицкий ; заявитель и патентообладатель Аграрное научно-техническое общество «АнтексБиос». — № 94001523/15 ; заявл. 21.01.1994 ; опубл. 27.11.1995. — Бюл. № 27.
9. Влияние адъювантов на характеристики сывороток для лабораторной диагностики болезней с везикулярным синдромом / Ж. А. Шажко, Н. С. Маслова, Л. Ф. Шажко [и др.] // Разработка и использование новых адъювантов для биотехнических целей : Материалы семинара специалистов стран-членов СЭВ. — Владимир, 1990. — С. 38-39.
10. Грубман, М. Дж. Ящур / М. Дж. Грубман, Б. Бакст // Clinical Microbiology Reviews. — 2004. — Vol. 17, № 2. — Р. 465-493. — DOI: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004.

11. Дезинфицирующее средство для защиты строительных материалов от биоповреждений : патент № 2740197 Российская Федерация : МПК А61L 2/18, А61L 101/02, А61L 101/32, С09D 5/14 / К. С. Оробец, А. А. Худокормов, Э. В. Карасева [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет». — № 2020113857 ; заявл. 03.04.2020 ; опубл. 12.01.2021, Бюл. № 2.
12. Демидчик, Л. Г. Изучение иммуногенных свойств вируса ящура типа А, выделенного в Армении в 1998 г. [Опыты на бычках] / Л. Г. Демидчик // Ветеринария. Реферативный журнал. — 2001. — № 2. — С. 503.
13. Джамал, С. М. Молекулярная эпидемиология, эволюция и филогения вируса ящура / С. М. Джамал, Г. Дж. Белшем // Генетическая эволюция инфекции. — 2018. — № 59. — С. 84-98. — DOI: 10.1016/j.meegid.2018.01.020.
14. Дудников, А. И. Иммунологическая, профилактическая и противоэпизоотическая эффективность противоящурных вакцин / А. И. Дудников, С. А. Дудников, О. Н. Поляков // Ветеринарная наука - производству. — Минск, 2005. — Т. 38. — С. 189-195.
15. Дудников, А. И. Определение иммуногенности ГОА-формолвакцины из лапинизированного вируса ящура на белых мышах / А. И. Дудников, И. А. Пронин // Ящур: материалы научной конференции / ВНИЯИ. — Владимир, 1968. — С. 69-71.
16. Дудников, А. И. Противоящурный иммунитет и практические достижения в области противоящурной защиты / А. И. Дудников, В. В. Борисов, С. А. Дудников // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини : збірник наукових праць. — Харків, 2007. — Вып. 15(40), ч. 2, т. 1. — С. 116-120.
17. Дудникова, Е. К. Разработка и применение иммуноферментного анализа для выявления противоящурных антител в сыворотке крови животных : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Е. К. Дудникова. — Владимир, 1997. — 25 с.
18. Изучение гуморального иммунитета у животных, иммунизированных эмульсионными противоящурными вакцинами / С. Р. Кременчугская, Н. Н. Луговская, Т. К. Майорова, [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2017. — № 1(20). — С. 55-57. — EDN YQQDUF.
19. Изучение иммунобиологических свойств изолятов вируса ящура типа о, выделенных на территории Южной Кореи / А. А. Фунтиков, С. Р. Кременчугская, Т. К. Майорова [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2018. — № 1(24). — С. 49-54. — EDN YWMMHI.
20. Изучение противоящурной кристалл виолетовой термовакцины из очищенного лапинизированного вируса, изготовленной по методике ЦНИИЭВ / И. К. Толстяк, Е. В. Андреев, П. А. Конозенко [и др.] // Ящур : тематический сборник научных работ : в 2-х томах. — Владимир, 1974. — Т. 2. — С. 44-45.
21. Изучение формирования раннего иммунитета у естественно восприимчивых животных против ящура типа О / Д. В. Михалишин, Д. А. Лозовой, В.

А. Стариков [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2020. — № 2(33). — С. 94-101. — DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-94-101.

22. Иммунитет у мышей после введения ящурных антигенов / В. П. Онуфриев, В. К. Муравьев, А. В. Чепуркин [и др.] // Ящур : материалы научной конференции / ВНИИИ. — Владимир, 1968. — С. 51-53.

23. Иммунобиологические свойства противоящурной поливалентной вакцины нового поколения / В. В. Михалишин, А. И. Дудников, Н. А. Улупов [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных. — Владимир, 1995. — С. 217-222.

24. Иммунологические свойства инаktivированных сорбированных вакцин из штаммов вируса ящура / В. А. Стариков, В. Ю. Кулаков, В. В. Михалишин [и др.] // Ветеринария и кормление. — 2010. — № 6. — С. 30-32.

25. Инфекционная патология животных / А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, В. И. Еремец [и др.] // Москва, 2014. — Т. 1. — 264 с.

26. Использование препаратов полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГ ГХ) в лечении ран / Т. О. Курицкая, Н. М. Наумов, А. А. Железнякова [и др.] // Региональный вестник. — 2017. — № 1(6). — С. 2-9.

27. Испытание адъювантов серии montanide для получения детекторных антител к вирусу ящура / Т. К. Майорова, С. Р. Кременчугская, Н. Е. Камалова [и др.] // Ветеринарный врач. — 2011. — № 5. — С. 29-32.

28. Камалова, Н. Е. Экспресс-диагностика для идентификации и серологического мониторинга при ящуре / Н. Е. Камалова // Ветеринария. — 2010. — № 6. — С. 22-26.

29. Касич, И. Н. Экспериментальные модели аутоиммунных патологических процессов при использовании Адъюванта Фрейнда / И. Н. Касич, Л. А. Ермакова, Л. Б. Ящинский // Молодой ученый. — 2016. — № 29-2(133). — С. 18-22.

30. Коэффициент корреляции титра противоящурных антител с процентом защиты вакцинированных животных от ящура / Н. И. Ефимов, С. А. Цветкова, Н. С. Мамков [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. — Владимир, 1987. — Ч. 2. — С. 6-7.

31. Кременчугская, С. Р. Биологические свойства эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных в период с 1990 по 2014 гг. : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / С. Р. Кременчугская. — Владимир, 2018. — 35 с.

32. Курченко, Г. А. Изучение антигенной и генетической изменчивости полевых штаммов вируса ящура типа А, выделенных в случаях эпизоотий на фермах, расположенных в различных регионах шт. Сан-Паулу, Бразилия / Г. А. Курченко // Ветеринария. Реферативный журнал. — 2005. — № 4. — С. 1246.

33. Мамков, Н. С. Масляные адъюванты для противоящурных вакцин : диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Н. С. Мамков. — Владимир, 1999. — 258 с.

34. Методические рекомендации по выделению и идентификации штаммов вируса ящура / А. А. Гусев, В. М. Захаров, Ж. А. Шажко [и др.]. — Владимир : ФГУ "ВНИИЗЖ", 2002. — 31 с. — Текст : непосредственный.
35. Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура : утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002 г. — Владимир, 2002. — 31 с.
36. Михалишин, В. В. Адъюванты и их использование / В. В. Михалишин, Н. С. Мамков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2008. — Т. 6. — С. 340-371.
37. Михалишин, Д. В. Инактивация культурального вируса ящура для изготовления противоящурных вакцин / Д. В. Михалишин // Ветеринария и кормление. — 2013. — № 5. — С. 28-29.
38. Михалишин, Д. В. Разработка технологии изготовления эмульсионной вакцины против ящура сельскохозяйственных животных: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Д. В. Михалишин. — Владимир, 2021. — 39 с.
39. Мищенко, В. А. Реакция задержки радиальной иммунодиффузии для выявления противоящурных антител / В. А. Мищенко, Ж. А. Шажко // Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции «Разработка, апробация и государственный контроль ветеринарных препаратов» 31 марта-2 апреля 1981 г. — Москва, 1981. — С. 147-148.
40. Нейтрализующая активность сыворотки крови КРС, переболевшего ящуром типа Азия-1 / В. М. Гневашев, В. Ю. Кулаков, О. В. Прунтова [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. — Владимир, 1988. — Ч. 1. — С. 41-42.
41. Никифорова, В. П. Показатели естественной резистентности организма крупного рогатого скота, инфицированного вирусом лейкоза / В. П. Никифорова // Труды ВИЭВ. — 1992. — Т. 72. — С. 103-108.
42. Николаенко, Н. И. Изыскание биологических методов активной борьбы с ящуром / Н. И. Николаенко // Сборник рефератов научной конференции. — Омск, 1941. — Т. 2. — С. 39-43.
43. Новые бесхлорные технологии в очистке и обеззараживании питьевой воды / М. Г. Новиков, С. И. Иванов, В. В. Малышев [и др.] // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. — 2012. — № 10(58). — С. 48-56.
44. Определение иммуногенных свойств противоящурной вакцины на мышцах. Сообщение 1. Сравнительное изучение количественных методов определения иммуногенности ГОА-формолвакцины типа О / В. П. Онуфриев, Ю. Ф. Швецов, А. И. Дудников [и др.] // Ящур : тематический сборник работ по проблемам ящура. — Владимир, 1970. — Т. 1. — С. 208-215.
45. Определение критериев для исследования флокулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида) / М. Н. Гусева, М. И. Доронин,

М. А. Шевченко [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 254-261. – DOI 10.29326/2304-196X-2022-11-3-254-261. – EDN SNHQYZ.

46. Определение степени защиты крупного рогатого скота от заражения вирусом ящура в зависимости от уровня поствакцинальных антител / А. М. Рахманов, Б. А. Глушко, В. И. Диев [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2005. — Т. 3. — С. 144-150.

47. Осипова, Н. И. Изучение иммуногенной активности эмульсионной и сорбированной вакцин из штамма культурального вируса ящура Азия-1/Шамир 3/89 на крупном рогатом скоте и свиньях / Н. И. Осипова // Ветеринария. Реферативный журнал. — 2008. — № 2. — С. 450.

48. Основные требования к качеству противоящурных вакцин / А. И. Дудников, В. В. Михалишин, С. А. Дудников [и др.] // Ветеринарна медицина : міжвідомчий тематичний науковий збірник. — Харків, 2003. — Вып. 82. — С. 216-219.

49. Особенности иммунного ответа у крупного рогатого скота и свиней на противоящурные вакцины, содержащие сорбированные и эмульгированные адьюванты / А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, Н. К. Еремец [и др.] // Ветеринарный врач. — 2011. — № 6. — С. 11-14.

50. Оценка иммунного статуса в стадах крупного рогатого скота / В. К. Муравьев, П. В. Малярец, В. П. Онуфриев [и др.] // Ветеринария. — 1979. — № 5. — С. 31-34.

51. ПГМГ-гидрохлорид – полигексаметиленгуанидин гидрохлорид. Институт эколого-технологических проблем (ООО ИЭТП) : сайт. — URL: <http://polyguanidines.ru> (дата обращения: 01.12.2021). — Текст : электронный.

52. Проблема клинической диагностики ящура у овец и коз / А. В. Мищенко, В. А. Мищенко, В. Н. Шевкопляс [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 6. – С. 8-10. – EDN YOYEAN.

53. Ранозаживляющее действие гидрогеля на основе полигуанидинов / О. С. Очиров, Я. Г. Разуваева, Н. С. Бадмаев [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. — 2016. — № 1(5). — С. 117–120. — DOI: 10.12737/23405.

54. Рахманов, А. М. Эпизоотическая ситуация по ящуру животных на Северном Кавказе / А. М. Рахманов, А. В. Мищенко, С. Н. Фомина // Вестник ветеринарии. — 2014. — Т. 69, № 2. — С. 11-14.

55. Роль адьювантов в противоящурной вакцине для экстренной защиты / Д. В. Михалишин, Н. Д. Клюкина, Н. Н. Ходакова [и др.] // Ветеринарная патология. — 2006. — № 4(19). — С. 46-48.

56. Салажев, Е. Л. Оценка активности противоящурной вакцины по уровню вирусонейтрализующих антител / Е. Л. Салажев, Т. Я. Тарасенко, В. И. Еремец // Вирусы. Болезни сельскохозяйственных животных : тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции. — Владимир, 1995. — С. 115.

57. Салажов, Е. Л. Оценка методов контроля иммуногенности вакцин / Е. Л. Салажов, А. М. Сандомирский // Разработка методов проверки биологических свойств производственных штаммов микроорганизмов и диагностических препаратов : сборник научных трудов / ВГНКИ. — Москва, 1983. — С. 88-91.
58. Самиа, М. Вакцинация против ящура и поствакцинальный мониторинг. Руководство ФАО и МЭБ / М. Самиа, М. Сюзанна. — 2019. — 83 с.
59. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер. — Москва : Библионика, 2007. — 524 с.
60. Сидорчук, А. А. История создания вакцин и вакцинации. Часть V. Ящур / А. А. Сидорчук // Российский ветеринарный журнал. — 2020. — № 2. — С. 27-30.
61. Совершенствование технологии и методов контроля при изготовлении противоящурных вакцин / В. И. Еремец, А. Я. Самуйленко, Е. Л. Салажов [и др.] // Науковий вісник НАУ. — Київ, 2001. — Т. 36. — С. 260-263.
62. Способы получения высокоактивных иммунных сывороток и экстренной защиты животных от ящура / А. И. Дудников, В. В. Михалишин, Р. Л. Алексанян [и др.] // Современные аспекты ветеринарной патологии животных. — Владимир, 1998. — С. 41-48.
63. Сравнительное изучение активности сорбированных и эмульсионных вакцин для крупного рогатого скота / В. А. Стариков, Д. В. Михалишин, Т. Н. Лезова [и др.] // Ветеринария. — 2015. — № 3. — С. 21-26.
64. Сравнительное изучение иммуногенной активности противоящурных сорбированных и эмульсионных вакцин / Е. В. Белик, В. Н. Боровой, А. Ф. Бондаренко, [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. — Владимир, 1987. — Ч. 1. — С. 20-21.
65. Сравнительное изучение инактивирующей активности азиридинов по отношению к вирусу ящура / Т. Н. Улупова, Н. А. Улупов, С. С. Рыбаков, [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии : тезисы докладов научной конференции ВНИИИ. — Владимир, 1983. — С. 37-39.
66. Тест-система на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА для определения титра антител против вируса ящура штамма А N2269/ВНИИЗЖ/2015 генотипа А/ASIA/G-VII в сыворотках крови животных после иммунизации : патент № 2787714 С1 Российская Федерация : МПК А61К 39/42 / Н. Н. Луговская, М. И. Доронин, Д. В. Михалишин [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ВНИИЗЖ». — № 2022108324 ; заявл. 28.03.2022 ; опубл. 11.01.2023, Бюл. № 2.
67. Улупов, Н. А. Влияние буферного раствора на инактивацию вируса ящура формальдегидом / Н. А. Улупов // Ветеринария. — 1974. — № 9. — С. 38-39.
68. Улупов, Н. А. Изучение активности химических препаратов при инактивации вируса ящура / Н. А. Улупов, А. И. Дудников // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии : тезисы докладов научной конференции ВНИИИ. — Владимир, 1983. — С. 34-35.

69. Улупов, Н. А. Лапинизированная противоящурная вакцина ФГУ «ВНИИЗЖ» / Н. А. Улупов, А. И. Дудников, В. В. Михалишин // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2008. — Т. 6. — С. 323–340.

70. Улупов, Н. А. Методика оценки инактивирующих свойств химических препаратов / Н. А. Улупов. — Владимир, 1980. — 4 с.

71. Устойчивость крупного рогатого скота к заражению вирусом ящура в зависимости от уровня поствакцинальных антител в ИФА / А. М. Рахманов, В. М. Захаров [и др.] // Ученые записки Витебской Государственной академии ветеринарной медицины. — Витебск, 2004. — Т. 40, ч. 1. — С. 282-283.

72. Феррари, Д. Вакцинация против ящура и поствакцинальный мониторинг / Д. Феррари, Д. Пейтон, С. Дуффи, К. Бартелс, Т. Найт-Джонс // ФАО и МЭБ. — 2019. — 83 с.

73. Филогенетическая характеристика изолятов вируса ящура типа О, выделенных в Российской Федерации / Д. А. Лозовой, А. В. Щербаков, В. М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 2018. — № 5. — С. 3-8. — DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.5.03-08.

74. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, выявленных на постсоветском пространстве и в Монголии в 2016 году / А. М. Тимина, Н. Г. Зиняков, А. В. Щербаков [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2017. — № 4. — С. 3-8.

75. Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура / А. В. Щербаков, А. М. Тимина, А. С. Яковлева [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2006. — Т. 4. — С. 12-15.

76. Фомина, С. Н. Современные подходы к диагностике и профилактике ящура в приграничных регионах Российской Федерации / С. Н. Фомина, Д. А. Лозовой // Ветеринария сегодня. — 2022. — Т. 11, № 2. — С. 130–137. — DOI 10.29326/2304-196X-2022-11-2-130-137.

77. Фунтиков, А. А. Вспышки ящура на территории Южной Кореи и экономические последствия / А. А. Фунтиков, С. Р. Кременчугская // Ветеринария сегодня. — 2017. — № 1(20). — С. 30-33. — EDN YQQDSH.

78. Хаширова, С. Ю. Дезинфицирующий полимерный антисептик : патент № 2754222 Российская Федерация : МПК А01N 33/12, А01N 37/04, А01P 1/00 / С. Ю. Хаширова, А. А. Жанситов, З. Ф. Хараева, С. С. Хаширова ; заявитель и патентообладатель ООО «Полимерные композиты». — № 2021105456 ; заявл. 03.03.2021 ; опубл. 30.08.2021, Бюл. № 25.

79. Шажко, Ж. А. Повышение чувствительности РРИД при обнаружении ящурных антител / Ж. А. Шажко, В. А. Мищенко // Ветеринария. — 1984. — № 1. — С. 70-71.

80. Шевкопляс, В. Н. Обеспечение эпизоотического благополучия и безопасности в ветеринарно-санитарном отношении продукции животного

происхождения российского производства в Краснодарском крае / В. Н. Шевкопляс // Ветеринария. — 2008. — № 5. — С. 2-5.

81. Шоош, Т. Исследование напряженности и продолжительности иммунитета у различных возрастных групп КРС, привитого противоящурной вакциной отечественного производства / Т. Шоош, А. Фазекам // Материалы 2-го симпозиума специалистов стран-членов СЭВ по проблеме «Профилактика и эффективная борьба с ящуром, а также создание высокоэффективных вакцин», 28-31 мая 1987. — София, 1988. — С. 194-204.

82. Щербаков, А. В. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России в 2013 году / А. В. Щербаков, А. М. Тимина, Н. Г. Зиняков // Ветеринария. — 2014. — № 7. — С. 22-25.

83. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире и меры борьбы с ним / А. М. Рахманов, В. В. Борисов, В. В. Михалишин [и др.] // Ветеринария. — 2007. — № 11. — С. 3-6.

84. Эпизоотологический надзор по ящуру в популяции диких животных на примере Забайкальского края / В. В. Никифоров, Т. В. Вадопалас, Д. А. Лозовой [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2019. — № 2(29). — С. 17-29. — DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-17-23.

85. Эффективность сорбированной бивалентной вакцины против гетерологичных штаммов вируса ящура типа А / Д. А. Лозовой, Д. В. Михалишин, Т. Н. Лезова [и др.] // Ветеринария. — 2016. — № 2. — С. 16-19.

86. Эффективность сорбированной вакцины против гетерологичных штаммов вируса ящура типа А / Д. А. Лозовой, Д. В. Михалишин, Т. Н. Лезова [и др.] // Ветеринария. — 2016. — № 2. — С. 16-19.

87. Ящур / А. Н. Бурдов, А. И. Дудников, П. В. Малярец [и др.]. — Москва : Агропромиздат, 1990. — 320 с.

88. Ящур в Казахстане / С. Б. Тюлегенов, А. Жакупбаев, М. Бердикулов [и др.] // Transboundary and Emerging Diseases. — 2022. — Т. 69, № 4. — С. 1712-1714. — DOI: 10.1111/tbed.14607.

89. A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology / G. Chénard, K. Miedema, P. Moonen [et al.] // Journal of Virological Methods. — 2003. — Vol. 107. — P. 89-98. — DOI: 10.1016/S0166-0934(02)00196-9.

90. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and mouth disease virus / N. P. Ferris, A. N. Bulut, T. Rendle [et al.] // Session Research Group. European Commission for Control of FMD, Bulgaria 5-8 Sept. 2000. — Rome, 2000. — P. 197-207.

- 91.** A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus / D. K. Mackay, A. N. Bulut, T. Rendle [et al.] // *Journal of Virological Methods*. — 2001. — Vol. 97(1-2). — P. 33-48. — DOI: 10.1016/s0166-0934(01)00333-3.
- 92.** Aguilar, J. C. Vaccine / J. C. Aguilar, E. G. Rodriuez. — 2007. — Vol. 25. — P. 3752-3762.
- 93.** Ahl, R. Further studies on the assessment of potency of FMD vaccines by means of antibody assays with sera from vaccinated cattle / R. Ahl, G. Wittmann // *Report of Meeting of Research Group of Standing Technical Committee of the European Commissions for the Control of Foot and Mouth Disease*. — Rio de Janeiro, 1985. — P. 45-49.
- 94.** Alan, J. C. Principles of Molecular Virology / J. C. Alan. — Department of Biology, University of Leicester, UK, 2016. — P. 38-39.
- 95.** Allende, R. M. South American standarts for foot-and-mouth disease vaccine quality / R. M. Allende, R. M. Mendes da Silva, D. J. Comparsi // *FMD: Control Strategies Int. Symp., Proc., Lyons, 2002. — Paris, 2003. — P. 331-336.*
- 96.** An overview on ELISA techniques for FMD / L. N. Ma, J. Zhang, H. T. Chen [et al.] // *Virology Journal*. — 2011. — Vol. 8. — P. 419. — DOI 10.1186/1743-422X-8-419.
- 97.** An overview on ELISA techniques for FMD / L. N. Ma, J. Zhang, H. T. Chen [et al.] // *Virology Journal*. — 2011. — Vol. 8. — P. 419. — DOI: 10.1186/1743-422X-8-419.
- 98.** Application of a monoclonal antibody based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera / E. Brocchi, F. De Simone, M. Bugnetti [et al.] // *Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Session of the Research Group of the Standing Technical Committee)*, Lindholm, Denmark, Appendix 14. — FAO, Rome, Italy, 1990.
- 99.** Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina / B. Robiolo, P. R. Grigera, O. H. Periolo [et al.] // *Vaccine*. — 1995. — Vol. 13(14). — P. 1346-1352. — DOI: 10.1016/0264-410X(95)00058-I.
- 100.** Assessment of the relationship between serum neutralizing antibody titre and liquid phase blocking ELISA titre in immune response to FMDV Vaccine / R. P. Tamil Selvan, B. P. Sreenivasa, Madhusudan Hosamani [et al.] // *Gera-newsletter-May-2016-Final-low.pdf*.
- 101.** Bahnemann, H. G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production / H. G. Bahnemann // *Archives of Virology*. — 1975. — Vol. 47(1). — P. 47–56. — DOI: 10.1007/BF01315592.
- 102.** Bahnemann, H. G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine / H. G. Bahnemann // *Vaccine*. — 1990. — Vol. 8(4). — P. 299–303. — DOI: 10.1016/0264-410x(90)90083-x.

103. Barteling, S. J. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccine / S. J. Barteling, R. Woortmeyer // Archives of Virology. — 1984. — Vol. 80(2–3). — P. 103–117. — DOI: 10.1007/BF01310652.

104. Bemat, S. A víruskorombositesi proba (S-index) ectekelese a ragodos szaj-es Koromfajas elleni vakcinak hatekongasagi vizsgalata soran / S. Bemat, G. Kucsera, T. Soos // Evk 1976-1980. Allatgyagy. Oltoanyagellenorzo intez. — Budapest, 1981. — P. 41-46.

105. Brocchi, E. The use of serology as part of the exit strategy to the 1996 epidemic of FMD in the Balkans / E. Brocchi, K. Sorensen, D. Mackay // Control of Infections Animal Disease by Vaccination: Proceedings of the Conference, Buenos Aires, 2004. — Basel, 2004. — Vol. 119. — P. 283-292.

106. Brown, F. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease / F. Brown, J. Crick // The Journal of Immunology. — 1959. — Vol. 82(5). — P. 444–447. — PMID: 13641679.

107. Challenges of Generating and Maintaining Protective Vaccine-Induced Immune Responses for Foot-and-Mouth Disease Virus in Pigs / N. A. Lyons, Y. S. Lyoo, D. P. King [et al.] // Frontiers in Veterinary Science. — 2016. — Vol. 3. — P. 102. — DOI: 10.3389/fvets.2016.00102.

108. Clavigio, A. Development in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in FMD / A. Clavigio, P. Wright, P. Kitching // Veterinary Journal. — 2004. — Vol. 167. — P. 9-22.

109. Clavijo, A. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease / A. Clavijo, P. Wright, P. Kitching // The Veterinary Journal. — 2004. — Vol. 167(1). — P. 9-22. — DOI: 10.1016/S1090-0233(03)00087-X.

110. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus / E. Brocchi, I. E. Bergmann, A. Dekker [et al.] // Vaccine. — 2006. — Vol. 24(47-48). — P. 6966-6979. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.050.

111. Comparative study for immune efficacy of two different adjuvants bivalent FMD vaccines in sheep / A. M. A. Selim, N. Z. Abouzeid, A. M. Aggour [et al.] // Journal of American Science. — 2010. — Vol. 6, № 10. — P. 1292-1298.

112. Comparison of foot-and-mouth disease vaccine potency testing on cattle in terms of the nature of the diluent / C. Stellmann, J. Terre, H. Favre [et al.] // Archives of Virology. — 1977. — Vol. 54. — P. 61-74.

113. Conclusions of the 14-th Conference of the OIE Commission on Foot-and-Mouth Disease // Bulletin of the Office International des Epizooties. — 1975. — Vol. 83. — P. 557-559.

114. Controle d'activite du vaccin anti-aphteux sur bovins: methode quantitatives d'extinction antigenique / J. Terre, A. Brun, C. Stellmann [et al.] // *Developments in Biological Standardization*. — 1977. — Vol. 35. — P. 357-367.

115. Controle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Etude de la loi dose-effet et correlation entre les doses vaccinales 50 % chez les cobayes et les bovidés / C. Mackowiak, J. Fontaine, C. Stellmann [et al.] // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1966. — Vol. 65, № 1-2. — P. 131-171.

116. Controle quantitatif du vaccin antiaphteux. Analyse statistique de la relation liant les titres d'anticorps neutralisant au pourcentage de protection bovine / C. Stellmann, P. Bornarel, R. Lang [et al.] // *Recueil de Médecine Vétérinaire*. — 1968. — Vol. 144. — P. 325-351.

117. Controle quantitatif du vaccin anti-aphteux I. Determination de la dose vaccinale 50% chez le bovin / J. Terre, P. Bornarel, C. Stellmann [et al.] // *Recueil de Médecine Vétérinaire*. — 1965. — Vol. 141, № 11. — P. 1109-1150.

118. Cunha, R. G. Epreuve de protection par le vaccin antiaphteux des lea jeunes souris adultes / R. G. Cunha // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1960. — Vol. 53. — P. 676.

119. De Leeuw, P. W. Vaccination of pigs with formaldehyde inactivated aluminium hydroxide foot-and-mouth disease vaccines potentiated with diethylaminoethyl-dextran / P. W. De Leeuw, J. W. A. Tiessink, S. Frenkel // *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. — 1979. — Vol. 26, № 8. — P. 85.

120. Development of a quick and simple detection methodology for foot-and-mouth disease virus serotypes O, A and Asia 1 using a generic RapidAssay Device / M. Yang, M. Goolia, W. Xu [et al.] // *Virology Journal*. — 2013. — Vol. 10. — P. 125. — DOI: 10.1186/1743-422X-10-125.

121. Duree de Timm unite conferee par la vaccination anti-aphteuse du porc / G. Dannacher, M. Fedida, M. Coudert [et al.] // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1972. — Vol. 77. — P. 1100, 183.

122. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot- and-mouth disease virus. 3. Evaluation after infection and vaccination / C. Hamblin, R. P. Kitching, A. L. Donaldson [et al.] // *Epidemiology and Infection*. — 1987. — Vol. 99. — P. 733-744. — DOI: 10.1017/S0950268800066590.

123. Espinet, R. G. Funcion del diluyente usado para detenninar en bovinos y cobayos la dosis protectora 50% (DP50) para la medicion del valor inmunogeno de las vacunas antiaftosa / R. G. Espinet // *Gaceta Veterinaria, Buenos Aires*. — 1971. — Vol. 33, № 253. — P. 359-369.

124. Espinet, R. G. Nuevo tipo de vacuna antiaftosa a complejo glucovirico / R. G. Espinet // *Gaceta Veterinaria, Buenos Aires*. — 1951. — Vol. 13. — P. 265.

125. Estandartizacion de la tecnica de microneutralization para anticuerpos de virus de fiebre aftosa / G. Arbolaes, M. O. de Bustos, A. G. de Gerardino [et al.] // Revista ICA. — 1979. — Vol. 14, № 2. — P. 87-92.

126. European Pharmacopoeia. — Third Edition. Section 5: 5.1.1. and 5.1.2. — Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1997.

127. Evaluation of Two Vaccines against Foot-and-Mouth Disease Used in Transcaucasian Countries by Small-Scale Immunogenicity Studies Conducted in Georgia, Azerbaijan and Armenia / E. A. Foglia, T. Chaligava, T. Aliyeva [et al.] // Vaccines. — 2024. — Vol. 12. — P. 295. — DOI: 10.3390/vaccines12030295.

128. Foot-and-mouth disease vaccines / F. Diaz-San Segundo, G. N. Medina, C. Stenfeldt [et al.] // Veterinary Microbiology. — 2017. — Vol. 206. — P. 102-112. — DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.018.

129. Evaluation du pouvoir immunisant du vaccin antiaphteux / J. Terre, P. Bornarel, P. Caillere [et al.] // Report of Meeting of Research Group of the European Commission for the Control of FMD. — Brescia, 1969. — P. 44-113.

130. Evolution et duree de l'immunité anti-aphteuse ches le boeuf primovacciné / F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher [et al.] // Bulletin of the Office International des Epizooties. — 1969. — Vol. 71. — P. 465-484.

131. Evolution of different adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine containing all SAT serotypes / M. Cloete, B. Dundu, L. J. Van staden [et al.] // Veterinary Research. — 2008. — Vol. 75, № 1. — P. 17-31.

132. Experience sur le controle d'efficacite des vaccins anti-aphteux par la determination de la dose protectrice 50% (PD50) ches el cobaye / C. Pappous, D. Brovas, R. Stouratis [et al.] // Bulletin of the Société Vétérinaire Hellénique. — 1967. — Vol. 18. — P. 1-13.

133. FAO. Foot-and-mouth Disease European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease January-March 2021 Quarterly Report. — FAO: Rome, Italy, 2020. — 48 p.

134. FAO. Foot-and-mouth Disease European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease October-December 2021 Quarterly Report. — FAO: Rome, Italy, 2022. — 47 p.

135. Fedida, M. Etude quantitative de l'etat irnmunitaire postvaccinal et des interrelations entre ses divers aspects dans une virose animale, la fievre aphteuse / M. Fedida // — Lyon, 1971. — 307 p.

136. Ferreira, M. E. V. Microtitreneutralisation test for the study of foot-and mouth disease antibodies / M. E. V. Ferreira // Boletim do Centro Panamericano de Febre Aftosa. — 1976. — № 21-22. — P. 21-23.

- 137.** Ferris, N. P. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases / N. P. Ferris, M. Dawson // *Veterinary Microbiology*. — 1988. — Vol. 16(3). — P. 201-209. — DOI: 10.1016/0378-1135(88)90024-7.
- 138.** Fontaine, J. Controle des vaccine anti-aphteux sur cobayes / J. Fontaine, M. Roumjantseff, C. Mackowiak // *Publications IFFA*. — 1963-1964. — P. 55-63.
- 139.** Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: WOAHP. Terrestrial Animal Health Code. — 2022. — Chapter 3.1.8. — URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
- 140.** Foot-and mouth disease immunity as dependant on vaccine dosis and on the reactivity of the organism / N. Muntiu, Donotary, A. Bergan [et al.] // *Archives of Veterinary Medicine*. — 1967. — № 2. — P. 5-20.
- 141.** Foot-and-mouth disease polyvalent oil vaccine inoculated repeatedly in cattle do not induce detectable antibodies to non-structural proteins when evaluated by various assays / A. Espinoza, E. Maradei, N. Mattion [et al.] // *Vaccine*. — 2004. — Vol. 23, № 1. — P. 69-77.
- 142.** Foot-and-Mouth Disease vaccination and Post-Vaccination Monitoring / G. Ferrari, D. Paton, S. Duffy [et al.] // *The Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Organization for Animal Health: Rome, Italy, 2016*.
- 143.** Foot-and-Mouth disease Vaccine potency testing: Determination and statistical Validation of a model using a serological approach / P. V. Barnett, R. J. Statham, W. Vasloo, D. T. Haydon // *Vaccine*. — 2003. — Vol. 21. — P. 3240-3248.
- 144.** Foot-and-mouth disease vaccine potency testing: determination and statistical validation of a model using a serological approach / P. V. Barnett, R. J. Statham, W. Vosloo [et al.] // *Vaccine*. — 2003. — Vol. 21. — P. 3240-3248. — DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00219-6.
- 145.** Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014 / B. P. Brito, L. L. Rodriguez, J. M. Hammond [et al.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. — 2017. — Vol. 64(2). — P. 316-332. — DOI: 10.1111/tbed.12373.
- 146.** Foot-and-Mouth Disease Virus: Immunobiology, Advances in Vaccines and Vaccination Strategies Addressing Vaccine Failures-An Indian Perspective / R. K. Singh, G. K. Sharma, S. Mahajan [et al.] // *Vaccines*. — 2019. — Vol. 7(3). — P. 90. — DOI: 10.3390/vaccines7030090.
- 147.** Foot-and-mouth disease: technical and political challenges to eradication / M. T. Smith, A. M. Bennett, M. J. Grubman [et al.] // *Vaccine*. — 2014. — Vol. 32(31). — P. 3902-3908. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.04.038.

- 148.** Fry, E. E. The structure of foot-and-mouth disease virus / E. E. Fry, D. I. Stuart, D. J. Rowlands // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2005. – Vol. 288. – P. 71–101. – DOI 10.1007/3-540-27109-0_4.
- 149.** Galea, M. Essais d'immunisation antiaphteuse du cobaye a l'aide d'un virus saponine / M. Galea, N. Tzortzakis // *Compte Rendu des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*. — 1932. — Vol. 109. — P. 21-23.
- 150.** Garland, A. I. M. An avaluation of some methods of assay of foot-and-mouth disease antigen for vaccines / A. I. M. Garland, G. N. Mowat, B. Fletton // *Developments in Biological Standardization*. — 1977. — Vol. 35. — P. 323-332.
- 151.** Geilhausen, H. E. Experiences over a period of three years with the practical employment of a diethylaminoethyl dextran (DEAE-D) containing foot-and-mouth disease (FMD) virus vaccine for pigs / H. E. Geilhausen // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1974. — Vol. 81, № 11-12. — P. 1055-1062.
- 152.** Haas, B. Prediction of protection by FMD vaccines on the basis of LPBE results / B. Haas // *Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the control of Foot-and-Mouth Disease*. — Chaina, Greece, 2004. — P. 341-342.
- 153.** Hamblin, C. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against FMD virus. I. Development and method of ELISA / C. Hamblin, I. T. R. Barnett, R. S. Hedger // *Journal of Immunological Methods*. — 1986. — Vol. 93, № 1. — P. 115-121.
- 154.** Hamblin, C. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against FMD virus. 2. Aplication / C. Hamblin, I. T. R. Barnett, G. R. Crowther // *Journal of Immunological Methods*. — 1986. — Vol. 93, № 1. — P. 123-129.
- 155.** Intemacional symposium on foot-and-mouth disease, Lyon, 1976. conclusion and recommendations // *Developments in Biological Standardization*. — 1977. — Vol. 35. — P. 488-490.
- 156.** International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy Report (10th Edition). — URL: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1> (дата обращения: 24.09.2023).
- 157.** Karber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche / G. Karber // *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. — 1931. — Vol. 162. — P. 480-483.
- 158.** Kitching, R. P. ELISA for selection of FMD vaccines / R. P. Kitching // *European Commission for the Control of FMD. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee : Report*. — Prague, Czechoslovakia, 20-23 Sept. 1988. — Rome, 1988. — 6 p.

159. Kitching, R. P. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus / R. P. Kitching, R. Rendle, N. P. Ferris // *Vaccine*. — 1988. — Vol. 6, № 5. — P. 403-408.

160. Knight-Jones T. J. D. The economic impacts of foot and mouth disease - What are they, how big are they and where do they occur? / T. J. D. Knight-Jones, J. Rushton // *Preventive Veterinary Medicine*. — 2013. — Vol. 112, № 3-4. — P. 161–173. — DOI 10.1016/j.prevetmed.2013.07.013.

161. Le controle d'activite sur bovis du vaccine anti-aphteux: proposition pour des norms minimales / J. Terre, G. Chappius, F. Perrenot [et al.] // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1972. — Vol. 77, № 7-8. — P. 1149-1174.

162. Lezova, T. N. Method of purification and sterilization of cultured foot-and-mouth virus : Patent № 2054039 Russian Federation : Int. C12N 7/02, A61K 39/135 / T. N. Lezova, N. A. Ulupov, V. V. Borisov, V. V. Mikhlishin, A. I. Dudnikov, P. A. Gembitskij ; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. — № 93025304/13 ; заявл. 05.05.1993 ; опубл. 10.02.1996.

163. Litchfield, J. T. A simplified method of evaluating dose-effect experiments / J. T. Litchfield, P. Wilcoxon // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. — 1949. — Vol. 96. — P. 99-113.

164. Lucam, F. Mesure de l'immunité antiaphteuse post-vacinale de boeuf au moyen d'une epreuve de sero-neutralisation en culture de tissus / F. Lucam, M. Fedida, G. Dannacher // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1966. — Vol. 65, № 11-12. — P. 1899-1906.

165. Lucam, F. Une nouvelle methode quantitative pour l'appréciation de l'immunité anti-aphteuse / F. Lucam, M. Fedida // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1958. — Vol. 49, № 9-10. — P. 596-621.

166. Mackay, D. FAO Phase XIV – Standardisation for FMD antibody detection ELISA / D. Mackay, F. Davidson, T. Rendle // In European Commission for Control of Foot-and-mouth Disease, Session of the Research Group of the Standing Technical Committee, 2–6 September Kibbutz Ma'ale Hachamisha, Israel. — 1996.

167. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.8. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus) / World Organisation for Animal Health (OIE). — Paris : OIE, 2018. — P. 433–464.

168. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — 5th ed. — Paris : OIE, 2004. — Vol. 1. — P. 111-128.

169. Martin, W. B. The tissue cultures colour test for assaying the virus and neutralising antibody of foot-and-mouth disease and its application to the measurement of immunity in cattle / W. B. Martin, W. G. Chapman // *Research in Veterinary Science*. — 1960. — № 2. — P. 53.

170. Melvin, P. A. Production of viral antigens with N-acetyl-ethyleneimine : Patent № US3318775A United States : Int. C12N7/00 / P. A. Melvin, J.-M. G. Pryce ; заявитель и патентообладатель Imperial Chemical Industries Ltd. — Заявл. 29.01.1963 ; опубл. 09.05.1967. — URL: <https://patents.google.com/patent/US3318775A/en>

171. Microneutralization test for subtyping of FMDV strains / M. M. Rweymamu, J. C. Booth, Morwen Head, T. W. F. Pay // Journal of Hygiene, Cambridge. — 1978. — Vol. 81. — P. 107-123.

172. Monoclonal antibody based phase competition ELISA to detect FMDV serotype A specific antibodies / R. H. Sayee, M. Hosamani, N. Krishnaswamy [et al.] // Journal of Virological Methods. — 2024.

173. Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle / P. Dar, R. Kalaivanan, N. Sied [et al.] // Vaccine. — 2013. — Vol. 31(33). — P. 3327-3332. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.078.

174. Muntiu, N. On the FMD antigen amount expressed in the PD50, to be included in a bovine dose / N. Muntiu // Report of Meeting of Research Group of the European Commission for the Control of FMD. — Pirbright, 1972. — P. 83-89.

175. Observations from the 2013 proficiency testing study (PTS) / A. Ludi, Y. Li, G. Wilsden [et al.] // Open Session Stand. Techn. Res. Comm. EuFMD, Cavtat (Croatia), 29-31 Oct., 2014. — URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/Open_Session_2014PPTS/Parallel29oct/WPar6.pdf (дата обращения: 5.08.2018).

176. OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Annual Report. — January–December 2010. — URL: http://www.wrlfmd.org/ref_labs/ref_lab_reports/OIEFAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Network%20Report%202010.pdf (дата обращения: 11.08.2018).

177. Park, J. H. Requirements for improved vaccines against foot-and-mouth disease epidemics / J. H. Park // Clinical and Experimental Vaccine Research. — 2013. — Vol. 2(1). — P. 8-18. — DOI: 10.7774/cevr.2013.2.1.8.

178. Paton, D. J. Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy / D. J. Paton, K. J. Sumption, B. Charleston // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2009. — Vol. 364(1530). — P. 2657-2667. — DOI: 10.1098/rstb.2009.0100.

179. Pay, T. W. F. Factors Influencing the Performance of Foot-and-Mouth Disease Vaccines under Field Conditions / T. W. F. Pay // In Applied Virology ; Academic Press Inc: Cambridge, MA, USA, 1984. — P. 73-86.

180. Pay, T. W. F. Foot and mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge / T. W. F. Pay, P. J. Hingley // Vaccine. — 1992. — Vol. 10, Issue 10. — P. 699.

- 181.** Some observations of FMD virus inactivation with acetyleneimine / T. W. F. Pay, R. C. Telling, B. L. Kitchener, [et al.] // In: European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee (22–24 October 1971, Tübingen, Germany). — Rome: FAO, 1972. — P. 81–86. — URL: <https://www.fao.org/3/ca9381en/ca9381en.pdf>.
- 182.** Pilz, W. Auswertungsergebnisse der Serum Neutralisationsteste / W. Pilz, W. Beck // Monatshefte für Tierheilkunde. — 1962. — № 14. — S. 91.
- 183.** Potency control of foot-and-mouth disease in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization / Y. L. Vianna Filho, V. Astudillo, I. Gomes [et al.] // Vaccine. — 1993. — Vol. 11, Issue 14. — P. 1424-1428.
- 184.** Preparation and use of laboratory methods to check effectiveness of FMD vaccines on cattle and swine / G. Thalmann, A. Moeckler, P. Felfe [et al.] // Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin. — 1987. — Vol. 41. — P. 806-811.
- 185.** Pustovalov, I. V. Method of determination of main substance main fraction in polyhexamethyleneguanidinechloride : Patent № 2336522 Russian Federation : Int. G01N 31/16 (2006.01) / I. V. Pustovalov, E. A. Emelin, V. Ju. Shcherba ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "ФАРМА-ПОКРОВ". — № 2007125199/04 ; заявл. 03.07.2007 ; опубл. 20.10.2008, Бюл. № 29.
- 186.** Rapid typing of foot-and-mouth disease serotype Asia 1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification / H. T. Chen, J. Zhang, Y. S. Liu, [et al.] // Virology Journal. — 2011. — Vol. 8. — P. 489. — DOI: 10.1186/1743-422X-8-489.
- 187.** Relation entre titre d'anticorps neutralisants et protection des animaux après vaccination antiaphteuse / C. Mackowiak, R. Lang, J. Fontaine [et al.] // Annales de l'Institut Pasteur. — 1962. — Vol. 103, № 2. — P. 252-261.
- 188.** Rivenson, C. Una nueva technics de evaluation de vacunas anti-aftosis en cobayos / C. Rivenson // Bulletin of the Office International des Epizooties. — 1960. — Vol. 53. — P. 679-692.
- 189.** Robiolo, B. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests / B. Robiolo, C. Seki, N. Fondevilla [et al.] // Vaccine. — 2006. — Vol. 24(7). — P. 997-1008. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.071.
- 190.** Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains-a review / D. Y. Paton, Y. F. Valacher, Y. Bergamann [et al.] // Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties). — 2005. — Vol. 24(3). — P. 981-993.
- 191.** Sellers, R. F. Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures / R. F. Sellers // Nature. — 1955. — Vol. 176. — P. 547.

192. Serological analysis of type O isolates of FMD from the Middle East 1981-88 / A. R. Samuel, E. Y. Ouldrige, A. E. M. Arrowsmith [et al.] // *Vaccine*. — 1990. — Vol. 8. — P. 390-395.

193. Sørensen, K. J. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus / K. J. Sørensen, K. G. Madsen, E. S. Madsen [et al.] // *Archives of Virology*. — 1998. — Vol. 143(8). — P. 1461-1476. — DOI: 10.1007/s007050050390.

194. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis / P. F. Wright, E. Nilsson, E. M. Van Rooij [et al.] // *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. — 1993. — Vol. 12(2). — P. 435-450. — DOI: 10.20506/rst.12.2.691.

195. Standardization of potency control method of FMDV on guinea pigs / F. E. Marcovechio, O. Zabal, M. V. Borca [et al.] // *Revista de Medicina Veterinaria*. — 1982. — Vol. 63, № 6. — P. 414-425.

196. Straub, O. C. Infections Bovine Rhinotracheitis Virus / O. C. Straub // *Virus Infections of Ruminants*. — Amsterdam, [etc.], 1990. — P. 71-108.

197. Sumption, K. Progressive control of FMD on a global scale / K. Sumption, J. Domenech, G. Ferrari // *Veterinary Record*. — 2012. — Vol. 170(25). — P. 637-639. — DOI: 10.1136/vr.e4180.

198. Sur la correlation entre le test de sero-neutralisation sur souriceaux et immunisation anti-aphteuse croisee chez les bovins / A. Bercan, N. Muntiu, V. Dohotaru, A. Tomescu // *Bulletin of the Office International des Epizooties*. — 1969. — Vol. 71. — P. 381.

199. Suttmoller, P. Potency estimation of FMD vaccines according to antibody assay results / P. Suttmoller, I. Gomes, V. Astudillo // *Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*. — Rome, 1983. — P. 62-65.

200. Suttmoller, P. The relationship of neutralising antibody titres for foot-and mouth disease virus and the protection of cattle / P. Suttmoller, A. Vieira // *Boletim do Centro Panamericano de Febre Aftosa*. — 1980. — Vol. 39-40. — P. 57-62.

201. Suttmoller, P. The serum microneutralization test for FMD: establishment an expected percentage of protection / P. Suttmoller, K. de Freitas Costa, I. Gomes // *Boletim do Centro Panamericano de Febre Aftosa*. — 1980. — № 39-40. — P. 37-42.

202. Technique de controle du vaccin anti-aphteux par Seroneutralisation sur culture de tissu / C. Mackowiak, R. Lang, J. Fontaine [et al.] // *Annales de l'Institut Pasteur*. — 1959. — Vol. 97, № 4. — P. 571-589.

203. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines / F. Brown, N. St. G. Hyslop, J. Crick [et al.] // *The Journal of Hygiene* (London). — 1963. — Vol. 61(3). — P. 337–344. — DOI: 10.1017/s0022172400039620.

204. The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines / F. Brown, N. St. G. Hyslop, J. Crick [et al.] // *The Journal of Hygiene* (London). — 1963. — Vol. 61(3). — P. 337–344. — DOI: 10.1017/s0022172400039620.

205. Toward the calibration of serological assays using sera collected from cattle and sheep following a single dose of foot-and-mouth disease vaccine / A. S. Karabassova, A. A. Sultanov, M. A. Saduarassova [et al.] // *Veterinary World*. — 2022. — Vol. 15. — P. 524–530.

206. Untersuchungen iiber die Beziehung zwischen der Reibungs und der intradermolingual Kontrollinfektion bei der Bestimmung der Wirksamkeit einer Maul - und Klauenseuche - Vakzine bei Rindern / N. Muntiu, V. Dohafaru, A. Bercan, A. Tomescu // *Deutsche tierarztliche Wochenschrift*. — 1966. — Vol. 73, № 3. — P. 61–63.

207. Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE) / G. A. Paiba, J. Anderson, D. J. Paton [et al.] // *Journal of Virological Methods*. — 2004. — Vol. 115(2). — P. 145–158. — DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.09.016.

208. Validation of an r3AB1-FMDV-NSP ELISA to distinguish between cattle infected and vaccinated with foot-and-mouth disease virus / J. P. Jaworski, D. Compaired, M. Trotta [et al.] // *Journal of Virological Methods*. — 2011. — Vol. 178(1–2). — P. 191–200. — DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.09.011.

209. Vallée, H. Sur l'immunisation anti-aphteuse par le virus formolé / H. Vallée, H. Carré, P. Rinjard // *Revue générale de Médecine vétérinaire*. — 1926. — Vol. 35. — P. 129–134.

210. Van Bakkum, J. G. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD virus / J. G. Van Bakkum // *Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, FAO*. — Brescia, 1969. — P. 38.

211. Van Bakkum, J. G. Neutraliserende antistoffen in sera van regen mond and Klauwzeer geente runderen : Thesis / J. G. Van Bakkum// — University of Utrecht, 1959.

212. Wagner, G. G. FMDV antibodies. Comparison of a tissue culture microneutralization test with the assay in suckling mice / G. G. Wagner, J. W. Mcvicar // *Applied Microbiology*. — 1970. — Vol. 20, № 6. — P. 995–997.

213. Warrington, R. E. Derivatives of aziridine as inactivants for foot-and-mouth disease virus vaccines / R. E. Warrington, H. R. Cunliffe, H. L. Bachrach // *American Journal of Veterinary Research*. — 1973. — Vol. 34(8). — P. 1087–1091. — PMID: 4356910.

214. Willems, R. Control of efficacy of inactivated foot-and-mouth disease vaccine / R. Willems // Report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee at the Institut Francais de la Fiebre Aphteuse. FAO, European Commission for the Controle of Foot-and-Mouth Disease. — Rome, 1966. — P. 23-31.

215. World Organization for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. — 2014. — Chapter 2.1.5. Foot-and-mouth disease OIE, Paris.

216. Yamal, S. M. Foot-and-mouth disease: Past, present and future / S. M. Yamal, G. Y. Belsham // Veterinary Research. — 2013. — Vol. 44. — P. 116.

217. Yunnan, Li. H. FMD vaccines and vaccination in China: production, use and quality / Li. H. Yunnan, S. Van, X. Tiangang // Book of abstracts: Scientific developments and technical challenges in the progressive control of FMD in South Asia. — New Delhi, India 13-15 February, 2012. — P. 29.

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по НИР
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

 И. А. Чвала
2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. начальника службы качества
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

 М. А. Четурная
2022 г.

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К СТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА
В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

СТО 00495527-0407-2022

Технические условия

Владимир
2022

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТЛОВА Л. Б.



Ключевые слова: набор, определение антител, антиген вируса ящура, структурные белки вируса ящура, иммуноферментный анализ, жидкофазный блокирующий вариант ИФА, активность, специфичность

Руководитель разработки:

Заведующий
лабораторией профилактики ящура

Д.В. Михалишин

Ответственный исполнитель:

Ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактики ящура

Н.Н. Луговская

Исполнители:

Ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактики ящура

А.В. Борисов

Ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактики ящура

М.И. Доронин

Старший научный сотрудник
лаборатории профилактики ящура

Т.В. Оковытая

Старший научный сотрудник
лаборатории профилактики ящура

М.Н. Гусева

Ведущий ветврач
лаборатории профилактики ящура

А.А. Харитонова

Ведущий ветврач
лаборатории профилактики ящура

М.А. Шевченко

Технолог 1 категории
лаборатории профилактики ящура

Ю.С. Елькина

Технолог 2 категории
лаборатории профилактики ящура

Ы.М. Гочмурадов

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТМЛОВА Л. Б.



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО КОНЦЕНТРИРОВАНИЮ АНТИГЕНА ВИРУСА ЯЩУРА С
ПОМОЩЬЮ ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ ФИЛЬТРАЦИОННОЙ УСТАНОВКИ

Авторы: Доронин М.И.
Михаилишин Д.В.
Гочмурадов М.М.
Борисов А.В.
Гусева М.Н.
Оковытая Т.В.
Елькина Ю.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 05
от «30» августа 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «11» сентября 2024 г.

Владимир 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТКОВА Л. Б.



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по НИР
И.А. Чвала
«26» апреля 2022 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ФЛОКУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПОЛИСЕНТА
(ПОЛИТЕКСАМЕТИЛЕНУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА)

Авторы:

Гусева М.Н.
Шевченко М.А.
Дорогин М.Н.
Гочмурадов Б.М.
Михаилишин Д.В.

Рассмотрено и одобрено
методической
Протокол № 02
от «13» апреля 2022 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 04
от «26» апреля 2022 г.

Владимир 2022

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



КОММЕРЧЕСКАЯ ТАЙНА
Область информации
ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Адрес местонахождения
600901, Владимирская область,
г. Владимир, мкр-он Юрьевец
рег. № 323 /КТ от 21.04.2022
п. 11 Перечня
283 3/3

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора по производству

(должность)

(подпись)

Мороз Наталья Владимировна

(ФИО)

« 12 » 04 2023 г.

УТВЕРЖДАЮ

Зам. руководителя службы качества

(должность)

(подпись)

Константинов Алексей Владимирович

(ФИО)

« 12 » 04 2023 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство набора для определения антител к структурным белкам
вируса ящура в иммуноферментном анализе

ПР-ЛПЯ-017/01

РАССМОТРЕНО И ОДОБРЕНО
методической комиссией

Протокол № 02

« 06 » 04 2023 г.

РАССМОТРЕНО Ученым советом
РЕКОМЕНДОВАНО к
утверждению

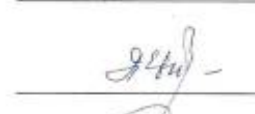
Протокол № 04

« 12 » 04 2023 г.

Владимир 2023 г.

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТКОВА Л. Б.

Подписи

Зам. руководителя научно-производственной службы		Бутина И.П.
Главный инженер		Рубачёв В.Р.
Заведующий лабораторией профилактики ящура		Михалишин Д.В.
Заведующий сектора биотехнологии лаборатории профилактики ящура		Луговская Н.Н.
Ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура		Доронин М.И.
Старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура		Оковытая Т.В.
Старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура		Гусева М.Н.
Младший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура		Елькина Ю.С.
Начальник отдела лаборатории профилактики ящура		Борисов А.В.
Старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура		Клюкина Н.Д.
Ветеринарный врач		Гочмурадов Б.И.М.
Ветеринарный врач		Силантьева Е.А.
Руководитель испытательной лаборатории ветпрепаратов		Яснова Е.А.
Начальник отдела управления качеством		Челурная М.П.
Ведущий инженер бюро охраны труда		Коровина Н.Е.
Начальник отдела биологической безопасности и ветеринарно- санитарного режима		Козлов Д.Ю.
Зам. начальника ОУК		Крашенинникова Ю.В.



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 815 540** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 7/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/135 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 7/00 (2023.08); *G01N 33/53* (2023.08); *C12Q 1/68* (2023.08); *A61K 39/135* (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023112450, 11.05.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.05.2023Дата регистрации:
18.03.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.05.2023

(45) Опубликовано: 18.03.2024 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ
"ВНИИЗЖ", Р.Н. Рыбину

(72) Автор(ы):

Луговская Наталья Николаевна (RU),
 Доронин Максим Игоревич (RU),
 Михалишин Дмитрий Валерьевич (RU),
 Оковитая Татьяна Владимировна (RU),
 Борисов Алексей Валерьевич (RU),
 Гочмурадов Ыхлас Мурадович (RU),
 Харитонов Анастасия Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение "Федеральный центр охраны
 здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ")
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 2640192 C1, 26.12.2017. CN
 102533663 B, 23.09.2015. RU 2674076 C1,
 04.12.2018. RU 2650768 C1, 17.04.2018.

(54) Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма "О N2212/Приморский/2014" генотипа O/SEA/Mya-98 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана тест-система жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа O/SEA/Mya-98 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Тест-система включает в себя специфические компоненты: культуральный инактивированный лиофилизированный вирус ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа O/SEA/Mya-98; сенсibilизирующие антитела

лиофилизированные иммуноглобулины G кролика против вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа O/SEA/Mya-98; детекторные антитела-лиофилизированные иммуноглобулины G морской свинки против вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа O/SEA/Mya-98. Изобретение расширяет арсенал средств для определения титра антител против вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014» генотипа O/SEA/Mya-98 методом жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. 1 з.п. ф-лы, 3 ил., 6 таб.



КОПИЯ ВЕРНА
 УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
 ПРОХВАТЛОВА Л. Б.

Стр. 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2798510

Тест-система для количественного определения уровня гуморального иммунитета животных против антигена вируса ящура A N 2205/G-IV генотипа A/AFRICA/G-IV с помощью жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)*

Авторы: *Доронин Максим Игоревич (RU), Луговская Наталия Николаевна (RU), Михалишин Дмитрий Валерьевич (RU), Гочмурадов Ыхлас Мурадович (RU), Борисов Алексей Валерьевич (RU), Воеводина Маргарита Эдуардовна (RU)*

Заявка № **2022122687**
Приоритет изобретения **22 августа 2022 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **23 июня 2023 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **22 августа 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности





КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.





