

## БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА BOVINE DISEASES

УДК 619:616.98:578.835.2:615.371:515-078

# ИЗУЧЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЭМУЛЬСИОННЫМИ ПРОТИВОЯЩУРНЫМИ ВАКЦИНАМИ

С.Р. Кременчугская<sup>1</sup>, Н.Н. Луговская<sup>2</sup>, Т.К. Майорова<sup>3</sup>, А.С. Шарыпов<sup>4</sup><sup>1</sup>ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kremenchugskaya@arriah.ru<sup>2</sup>ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lugovskaya@arriah.ru<sup>3</sup>ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mayorova@arriah.ru<sup>4</sup>ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sharipov@arriah.ru**РЕЗЮМЕ**

В работе представлены результаты изучения гуморального иммунитета у крупного рогатого скота после однократной иммунизации инактивированными эмульсионными противоящурными вакцинами на основе адъювантов Montanide ISA 70 и ISA 206 с использованием реакции нейтрализации и иммуноферментного анализа. Показано, что вакцины индуцируют выработку высокого уровня антител, который сохранялся в течение 70 суток после вакцинации (срок наблюдения).

Ключевые слова: противоящурные вакцины, адъюванты Montanide ISA, уровень антител, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ.

UDC 619:616.98:578.835.2:615.371:515-078

# STUDY OF HUMORAL IMMUNITY IN ANIMALS IMMUNIZED WITH EMULSION FMD VACCINES

S.R. Kremenchugskaya<sup>1</sup>, N.N. Lugovskaya<sup>2</sup>, T.K. Mayorova<sup>3</sup>, A.S. Sharipov<sup>4</sup><sup>1</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kremenchugskaya@arriah.ru<sup>2</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lugovskaya@arriah.ru<sup>3</sup>Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mayorova@arriah.ru<sup>4</sup>Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sharipov@arriah.ru**SUMMARY**

The paper demonstrates results obtained during the study of humoral immunity in cattle after single immunization with inactivated emulsion FMD vaccines based on Montanide ISA 70 and ISA 206 adjuvants. The humoral immunity was assessed using virus neutralization test and ELISA. The vaccines were demonstrated to induce high level of antibodies maintained for 70 days post vaccination (observation period).

Key words: FMD vaccines, Montanide ISA adjuvants, level of antibodies, virus neutralization tests, ELISA.

**ВВЕДЕНИЕ**

Для профилактики ящура необходимо применять вакцины, обуславливающие формирование быстрого и продолжительного иммунитета после однократной иммунизации. Однако не всегда используемые для профилактических целей препараты отвечают этим требованиям, поэтому для обеспечения защиты от заболевания в течение длительного времени осуществляется регулярная ревакцинация животных.

В последние годы многие исследователи проводили оценку гуморального иммунитета по титрам антител в сыворотке крови животных в серологических реакциях после иммунизации противоящурными вакцинами на основе различных адъювантов. Было установлено, что эмульсионные вакцины на основе адъювантов Montanide индуцируют более выраженный и продолжительный иммунный ответ у крупного рогатого скота и овец, что свидетельствовало о возможности замены ими коммерческих сорбированных препаратов для профилактической иммунизации животных [3–5].

Целью исследований являлось изучение гуморального иммунитета у животных, экспериментально иммунизированных эмульсионными вакцинами производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», с использованием микрометода реакции нейтрализации и иммуноферментного анализа.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

*Вакцины и вакцинация животных.* Для иммунизации животных применяли культуральные инактивированные моновалентные эмульсионные вакцины с типами эмульсий вода–масло и вода–масло–вода на основе адъювантов Montanide ISA 70 и Montanide ISA 206 из штамма вируса ящура типа А, относящегося к генетической линии Юго-Восточная Азия-97 (SEA-97) топотипа Азия.

Для испытания эмульсионных вакцин были использованы 2 группы по 17 голов взрослого крупного рогатого скота (КРС) массой 250–300 кг из хозяйств, где не проводится профилактическая вакцинация против

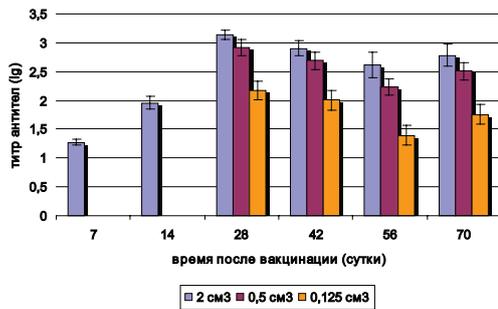


Рис. 1. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 70 в разных дозах

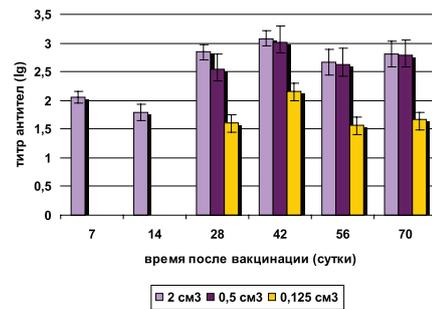


Рис. 2. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в ИФА у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 70 в разных дозах

ящура. Каждой подгруппе из 5 животных вводили вакцину в прививных объемах 2,0, 0,5 и 0,125 см<sup>3</sup>. Контролем служили по 2 невакцинированных животных.

Для сравнительного изучения эффективности вакцин животным третьей группы однократно вводили сорбированную (адъювант — гидроокись алюминия с сапонином) инактивированную моновалентную вакцину из того же штамма вируса ящура типа А в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup>.

**Сбор образцов.** От КРС отбирали пробы крови до вакцинации и через 7, 14, 28, 42, 56, 70 суток после вакцинации.

Полученные образцы сыворотки крови до использования хранили при температуре минус 20 °С.

**Серологические исследования.** Титры вируснейтрализующих антител в образцах сыворотки крови КРС определяли в реакции микронеutralизации (РМН) в 96-луночных культуральных планшетах против 100 ТЦД<sub>50</sub> вируса ящура типа А, гомологичного вакцинному штамму. Титром антител считали конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД<sub>50</sub> гомологичного вируса в 50% лунок.

Для исследования сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью жидкофазного блокирующего непрямого сэндвич-варианта использовали набор для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА согласно инструкции по его применению, утвержденной ФГБУ «ВНИИЗЖ». В состав набора входили вирусоспецифические компоненты, полученные на штамм вируса ящура А №2187/Кути/2013. За титр антител принимали величину, обратную конечному разведению сыворотки, в котором наблюдался процент ингибирования (PI) не менее 50%.

Титры антител в РМН и ИФА выражали в десятичных логарифмах (lg). Положительными считали пробы от животных с титром антител в сыворотке крови 1,68 lg и выше.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании образцов сыворотки крови, отобранных до начала вакцинации, установлено, что титры антител были ниже 1,2 lg.

Результаты исследований сыворотки крови животных в РМН и ИФА через 7, 14, 28, 56 и 70 суток после иммунизации животных эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 70 представлены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1 и 2, к 7 суткам после иммунизации КРС образование вируснейтрализующих антител в РМН и ИФА было отмечено у всех животных, привитых

эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 70 в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup>. Средние титры антител в сыворотке крови в этой группе КРС составляли 1,27±0,05 и 2,06±0,11 lg в РМН и ИФА соответственно. Возрастание титров антител отмечали в РМН с 7 по 28–42 сутки после вакцинации (p<0,05), при этом их максимальные значения составляли 3,15±0,08–2,9±0,13 lg. В ИФА титры антител на 7 и 14 сутки после иммунизации КРС не имели значимых различий (p>0,05), а затем статистически достоверно возрастали и достигали наиболее высоких значений 2,84±0,13–3,08±0,13 lg на 28–42 сутки после введения вакцины. С 42 по 70 сутки после вакцинации (срок наблюдения) титры антител в РМН и ИФА статистически значимых различий не имели (p>0,05) и на 70 сутки составляли в РМН 2,78±0,18 lg и в ИФА — 2,81±0,22 lg.

У КРС, иммунизированного в прививных объемах 0,5 и 0,125 см<sup>3</sup>, средние титры антител в РМН с 28 по 70 сутки после вакцинации статистически значимо не различались и составляли 2,92±0,12–2,51±0,15 и 2,17±0,19–1,75±0,09 lg. При исследовании сыворотки крови этих групп животных в ИФА наблюдали возрастание титров антител между 28 и 42 сутками после вакцинации с 2,54±0,21 до 3,01±0,16 lg и с 1,61±0,08 до 2,16±0,12 lg (p<0,05). Уровень антител в ИФА на 56–70 сутки составлял 2,63±0,27–2,78±0,2 и 1,57±0,14–1,66±0,17 lg для разных доз введенной вакцины соответственно.

Результаты исследований сыворотки крови КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 206 в РМН и ИФА, представлены на рис. 3 и 4.

При изучении иммунного ответа после иммунизации КРС инактивированной вакциной на основе масляного адъюванта Montanide ISA 206 в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup> было установлено, что антитела в РМН и ИФА начинали выявляться в титрах 1,54±0,13 и 2,63±0,14 lg через 7 суток. Максимальный уровень антител в РМН 3,22±0,08 lg и в ИФА lg 3,1±0,1 lg наблюдали через 28 и 42 суток соответственно. К 56–70 суткам после вакцинации уровень антител в РМН и ИФА не изменялся и составлял 2,69±0,28–2,71±0,19 lg и 2,73±0,18–2,81±0,17 lg соответственно.

В группе КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 206 в прививной дозе 0,5 см<sup>3</sup>, средние титры антител на 28 и 42 сутки после вакцинации достигали 2,89±0,1 и 2,99±0,19 lg, а на 70 сутки уровень антител в РМН и ИФА был 2,63±0,2 и 2,85±0,19 lg соответственно.

В группе животных, иммунизированных в дозе 0,125 см<sup>3</sup>, максимальные титры антител в РМН и

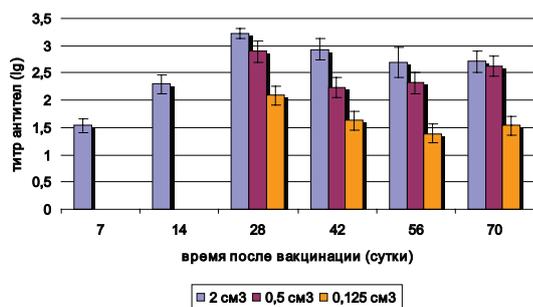


Рис. 3. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 206 в разных дозах

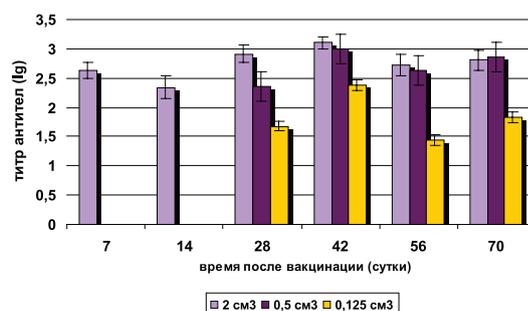


Рис. 4. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в ИФА у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адъювантом ISA 206 в разных дозах

ИФА на 28 и 42 сутки после вакцинации составляли  $2,09 \pm 0,12$  и  $2,39 \pm 0,07$  Ig и к 70 суткам снижались до  $1,63 \pm 0,06$  и  $1,84 \pm 0,08$  Ig.

Как следует из результатов, представленных на рис. 5, в сыворотке крови КРС, однократно иммунизированного инактивированной сорбированной вакциной, титры антител к вирусу ящура типа А в РМН и ИФА были значительно ниже, чем при иммунизации эмульсионными вакцинами. Наиболее высокий уровень антител  $1,8 \pm 0,36$ – $1,76 \pm 0,26$  Ig в РМН и  $2,16 \pm 0,16$ – $1,82 \pm 0,11$  Ig в ИФА отмечали на 14–28 сутки после вакцинации, но к 56–70 суткам титры были ниже уровня положительных значений, принятых для используемых реакций. Согласно инструкции по применению инактивированной сорбированной вакцины более продолжительный иммунитет в производственных условиях при иммунизации ранее не вакцинированных против ящура животных достигается двукратным введением препарата с интервалом 10–20 суток.

Ранее было показано, что титры поствакцинальных антител в сыворотке крови КРС 1,5 Ig и выше, полученные в жидкофазном блокирующем варианте ИФА с использованием предыдущей версии наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ», свидетельствуют о достаточной защите животных от заражения ящуром [1]. Ученые из исследовательского института IVRI (Индия) с помощью ROC-анализа показали, что минимальным титром в жидкофазном блокирующем варианте ИФА, соответствующим защитному титру в сыворотке крови КРС в реакции нейтрализации 1,8 Ig, является титр 2,1 Ig, однако авторы подчеркивают, что полученные данные необходимо сравнить с защитным статусом животных *in vivo* [2].

В исследованиях, представленных в данной статье, эмульсионные вакцины с адъювантами Montanide ISA 70 и ISA 206 при применении КРС в дозах 2,0 и 0,5 см<sup>3</sup> индуцировали образование антител, регистрируемых в ИФА и РМН в титрах выше 2,0 Ig, начиная с 28 суток после вакцинации на протяжении всего срока наблюдения. Полученные результаты позволяют предположить, что вакцинированные животные будут защищены от заражения вирусом ящура.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, однократное введение КРС инактивированных эмульсионных вакцин из антигена вируса ящура типа А на основе адъювантов Montanide ISA 206 и ISA 70 способствовало выработке антител, регистрируемых в течение всего срока наблюдения (70 суток после вакцинации) в ИФА и РМН в более высоких титрах, чем при иммунизации сорбированной вакциной.

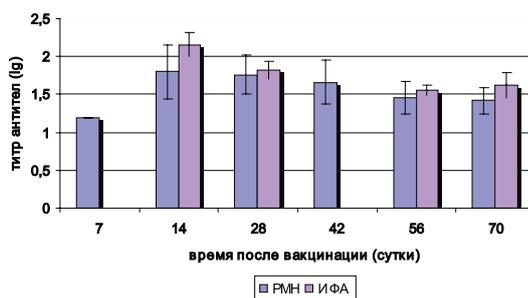


Рис. 5. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН и ИФА у КРС, иммунизированного сорбированной вакциной

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2005. — Т. 3. — С. 144–150.
2. Assessment of the relationship between serum neutralizing antibody titre and liquid phase blocking ELISA titre in immune response to FMDV vaccine / R.P.T. Selvan, B.P. Sreenivasa, M. Hosamani [et al.]. — URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/eufmd/commissions/eufmd-home/fmd-surveillance/situation-reports/en> (дата обращения: 16.05.16).
3. Comparative study for immune efficacy of two different adjuvants bivalent FMD vaccines in sheep / A.M.A. Selim, N.Z. Abouzeid, A.M. Aggour, N.M. Sobhy // J. Am. Sci. — 2010. — Vol. 6, № 10. — P. 1292–1298.
4. Early antibody responses of cattle for foot-and-mouth disease quadrivalent double oil emulsion vaccine / P.K. Patil, J. Bayry, S.P. Nair [et al.] // Vet. Microbiol. — 2002. — Vol. 87. — P. 103–109.
5. Longevity of protection in cattle following immunisation with emergency FMD A22 serotype vaccine from the UK strategic reserve / S.J. Cox, B.V. Carr, S. Parida [et al.] // Vaccine. — 2010. — Vol. 28. — P. 2318–2322.