

На правах рукописи

НИКИФОРОВ Виктор Викторович

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ЯЩУРА И АНТИТЕЛ В ПРОДУКТАХ УБОЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ**

**16.00.03 “Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология”**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Владимир – 2006

Никифоров

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных».

Научный руководитель – доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
ЗАХАРОВ Валерий Михайлович

Официальные оппоненты – доктор ветеринарных наук
ДИЕВ Вячеслав Иванович
(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», г. Владимир);
– кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
МУРТАЗИН Илжал Файзирахманович
(ФГУ «Всероссийский государственный Центр
качества и стандартизации лекарственных
средств для животных и кормов», г. Москва).

Ведущая организация: Государственное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной
вирусологии и микробиологии», г. Покров.

Защита диссертации состоится 29 июня 2006 г. в 10⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, п. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных».

Автореферат разослан 26 мая 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

Г.М. Семенова

Г.М. Семенова

2006А
14248

1. Общая характеристика работы

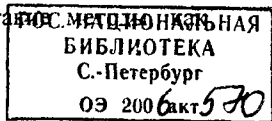
Актуальность темы. Успех организационных мер борьбы с ящуром во многом зависит от знания условий выживаемости вируса в продуктах убоя или в патологическом материале павших и вынужденно убитых животных, времени нахождения вируса в крови и тканях животных в различные стадии болезни. Кроме того, немаловажное значение имеет наличие и сохраняемость вируса у вакцинированных животных, контактировавших с больными.

Импортируемые продукты убоя животных, как правило, поступают в реализацию в замороженном состоянии, и если животное было убито в период болезни или вирусоносительства, то вирус ящура может сохраняться в органах и тканях в течение длительного времени и представлять эпизоотическую опасность (Московская область, 1995г.; Гонконг, 2005г.).

С 2000 года в лабораторию ящура и везикулярных болезней для исследования на наличие вируса ящура или его антигена поступило более 1000 проб мясопродуктов (свинины и говядины), импортируемых в Россию в виде полутуш, субпродуктов, мяса на костях, шейки, ребер, мяса в блоках из стран, неблагополучных по ящуру. Одним из экспортеров мяса в Россию является Монголия, с 2000 года неблагополучная по ящуру типа О.

Ранее проблемой индикации вируса ящура в продуктах убоя животных занимался ряд исследователей. В частности, С.А. Цветковой (1972) был предложен метод биопробы на культуре клеток. основным недостатком которого является длительность получения конечного результата. При ретроспективной диагностике Л.Б. Мезвришвили (1988) была использована непрямая реакция иммунофлюоресценции для выявления постинфекционных антител в тканях и органах животных. Кроме того, для проведения индикации антигена вируса ящура в органах и тканях Т.В. Тюриной (1994) был предложен метод флюоресцентных зондов, требующий последующей идентификации инфекционного агента в реакции нейтрализации.

В настоящее время при лабораторной диагностике ящура в объектах ветеринарного надзора наибольшее признание получили та



быстрая и высокочувствительная полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющие проводить прямую индикацию и специфическую идентификацию вирусного агента, реакция микронейтрализации (РМН) (В.М. Захаров, Ж.А. Шажко, Т.А. Фомина, 2002; Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals O.I.E., 2004).

Таким образом, изучение эффективности различных методов, позволяющих проводить индикацию и идентификацию возбудителя ящура в продуктах убоя и патологическом материале животных, а также изучение иммунобиологических свойств штаммов, циркулирующих в последнее время в неблагополучных по ящуру странах, остается актуальной и насущной проблемой в диагностике заболевания.

Цели и задачи исследований. Целью нашей работы явилась разработка схемы исследований для прямой индикации возбудителя ящура и противоящурных антител в продуктах убоя и патологическом материале от зараженных ящуром животных методами, которые позволили бы использовать наиболее вероятные с точки зрения обнаружения возбудителя ткани и органы и проводить диагностику в минимальные сроки.

Для выполнения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- испытать различные методы очистки и концентрирования суспензии патологического материала для осуществления прямой индикации и специфической идентификации антигена вируса ящура в ИФА после экспериментального заражения животных;

- изучить возможность обнаружения генома вируса ящура в ПЦР в пробах тканей и органов и сравнить с прямой индикацией антигена в ИФА и вирусовыделением в культуре клеток;

- провести сравнительные исследования продуктов убоя до и после их созревания;

- исследовать продукты убоя после заражения животных эпизоотическим штаммом вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004 и изучить его свойства;

- изучить возможность обнаружения противоящурных антител в продуктах убоя с помощью ИФА и РМН;
- исследовать продукты убоя, полученные от вакцинированных и затем зараженных ящуром животных, которые могут являться вирусоносителями;
- изучить и сравнить возможность обнаружения вирусного генома прямой индикацией антигена вируса ящура и противоящурных антител в пищеводно-глоточной жидкости (ПГЖ).

Научная новизна. Проведены исследования по обнаружению генома вируса ящура в продуктах убоя с помощью ПЦР.

Разработана схема очистки и концентрирования суспензии патологического материала для прямой индикации антигена вируса ящура.

Осуществлена прямая индикация и специфическая идентификация антигена вируса ящура в тканях животных методом ИФА без предварительной инокуляции чувствительных биосистем.

Проведены сравнительные исследования по обнаружению вирусного генома в ПЦР и антигена в ИФА в продуктах убоя до и после "созревания".

Представлена возможность выявления специфических противоящурных антител в продуктах убоя животных с применением ИФА и РМН.

Изучена возможность обнаружения возбудителя ящура и антител в продуктах убоя после экспериментального заражения вакцинированных животных.

Проведено исследование продуктов убоя в ПЦР, ИФА и РМН на разных стадиях заболевания, после экспериментального заражения животных эпизоотическим штаммом вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004, и изучены его иммунобиологические свойства.

Проведена сравнительная оценка возможности обнаружения генома вируса ящура в ПЦР, антигена в ИФА и антител в ИФА и РМН в различных органах и тканях на разных стадиях заболевания после экспериментального заражения.

Установлена возможность обнаружения вирусного генома, прямой индикацией антигена вируса ящура и противоящурных антител в ПГЖ.

Практическая значимость работы. Полученные результаты исследований использованы при подготовке следующих документов:

- “Методические указания по отбору, консервированию и транспортировке проб патологического материала и продуктов убоя для лабораторной диагностики ящура”, утвержденные директором ФГУ “ВНИИЗЖ” 29.09.2005 г.;
- “Методические указания по исследованию продуктов убоя животных при подозрении на ящур”, утвержденные директором ФГУ “ВНИИЗЖ” 02.06.2005 г.;
- штамп вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004 депонирован в ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (2004г.).
- проект “Правил профилактики и ликвидации ящура животных”, который находится на рассмотрении в МСХ РФ;

- проект “Программы совместных действий государств- участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах Содружества” (2006–2008гг.), который находится на рассмотрении в Россельхознадзоре МСХ РФ.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и опубликованы в сборнике Международной научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных», посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» в 2003г.; Международной научной конференции молодых ученых «Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных» в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г.Владимир, 2004г.; также докладывались на заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ (Республика Узбекистан) в 2006г. и на ученых советах ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2001-2005 гг.

Публикация научных работ. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Основные положения, выносимые на защиту:

- усовершенствованные методы очистки и концентрирования вирусосодержащих суспензий из проб патологического материала;

- способы прямой индикации антигена вируса ящура в продуктах убоя животных;
- методы исследования продуктов убоя для обнаружения генома вируса ящура;
- обоснование наиболее вероятных органов и тканей зараженных ящуром животных для обнаружения возбудителя при лабораторной диагностике ящура;
- иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004;
- определение противоящурных антител в тканях и органах животных методами ИФА и РМН;
- исследование пищеводно-глоточной жидкости с применением ПЦР, ИФА и РМН.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, содержит 26 таблиц, 12 рисунков и 3 приложения. Список литературы включает 237 наименований, из которых 122 отечественных и 115 иностранных.

2. Собственные исследования

Материалы и методы. Для экспериментального заражения животных были использовали штаммы вируса ящура А/Иран/96, О№1964/Монголия/2004, О₁№194/Волгоградский/58, О₁Manisa/Турция, С₁№564/Закарпатский/72, Азия-1 Иран 58/99.

Опыты проводили в ФГУ «ВНИИЗЖ», на крупном рогатом скоте (КРС) 10 - 12 - месячного возраста и свиньях в возрасте 4 - 5 месяцев, которых получали из хозяйства, благополучных по инфекционным заболеваниям.

Для постановки биопробы применяли мышат-сосунов в возрасте 4 – 7 дней. Вирусовыделение проводили на первичных и перевиваемых линиях культур клеток (КК) СП, ПСГК-30, IB-RS-2 и ВНК-21. При культивировании

клеток и наработке вирусов применяли среду Игла и ГЛА на растворах Эрла или Хенкса с добавлением антибиотиков в рабочих концентрациях.

Подготовка материала к исследованию. В качестве материала для исследований отбирали органы и ткани животных, экспериментально зараженных вирусом ящура 10% суспензией афтозного материала, которую вводили в слизистую оболочку языка КРС и в область венчика у свиней в количестве 10 тыс. ИД₅₀/0,1мл. Для заражения использовали вакцинированных и невакцинированных животных. Заражение КРС проводили на 21 день после противоящурной вакцинации цельной дозой, 1/4 дозы и 1/8 дозы препарата. У КРС и свиней после убоя отбирали слизистую оболочку глотки и пищевода, слизистую оболочку языка, поверхностные шейные, надколенные, подколенные, портальные, заглоточные лимфоузлы, мышцы спины и бедра, костный мозг, подкожный жир, надпочечники, поджелудочную железу, легкие, миндалины. У КРС также отбирали подчелюстные лимфоузлы и кровь.

Патологоанатомическое исследование животных проводили совместно с доктором ветеринарных наук, профессором ФГУ «ВНИИЗЖ» А.М. Рахмановым.

Пищеводно-глоточную жидкость (ППЖ) отбирали через 1, 5 и 8 суток после заражения животных.

Различные продукты убоя отбирали через 1, 4, 5 и 8 суток после экспериментального заражения при убое вакцинированных и невакцинированных животных.

Испытуемый материал подвергали очистке путем добавления фреона-113 в количестве 20% от общего объема или хлороформа - 8% от общего объема. Для микрофльтрации использовали мембраны МФАС-П-4, МФАС-П-3, МФАС-П-2, МФАС-П-1 («ВЛАДИПОР») с размером пор от 0,05 до 4,5мкм.

Концентрирование вирусосодержащей суспензии проводили следующими методами: осаждением полиэтиленгликолем М-6000 (ПЭГ); ультрафльтрацией через мембраны производства «ВЛАДИПОР», марок УАМ-300П, УАМ-500П, УАМ-1000П; мембраны производства «SARTORIUS», марки Vivacell 100; мембраны AMICON и фильтры IMMERSIBLE CX-30

производства "MILLIPORE" с номинальной отсекаемой молекулярной массой 50000–65000 D.

Специфический антиген вируса ящура выявляли в ИФА после концентрирования 10% суспензии проб тканей и органов ультрафильтрацией. Противоящурные антитела определяли в ИФА и РМН в 33% суспензии патматериала, очищенной фреоном-113. Для выделения РНК из продуктов убоя использовали 10% суспензии ткани без предварительной очистки. Образцы исследуемой пищеводно-глоточной жидкости перед исследованием в ПЦР разбавляли STE-буфером 1:1. Для исследования в ИФА и РМН проводилась предварительная очистка фреоном 113.

Иммунохимические реакции, применяемые в работе. При постановке РСК для определения антигенного родства изолятов вируса ящура использовали схему РСК по 100% гемолизу с перекрестным титрованием штаммоспецифических сывороток с гомологичными и гетерологичными антигенами.

Выявление антигена вируса ящура проводили в непрямом двойном сэндвич-варианте ИФА с помощью диагностического набора, выпускаемого ФГУ «ВНИИЗЖ», согласно «Временному наставлению по выявлению антигена вируса ящура в пробах материала иммуноферментным анализом», утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 22.04.02 г.

Обнаружение специфических противоящурных антител к вирусу ящура проводили в жидкофазном блокирующем сэндвич-варианте ИФА с помощью диагностического набора, выпускаемого ФГУ «ВНИИЗЖ», согласно «Наставлению по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных иммуноферментным анализом», утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 03.02.04 г.

Для определения постинфекционных противоящурных антител к неструктурным полипротеинам вируса ящура использовали наборы для определения антител к неструктурным полипротеинам вируса ящура в ИФА

фирм “Cedi-Diagnostics B.V.” (Нидерланды) и “Bommelli Diagnostics” (Швейцария).

Реакцию микронеutralизации (РМН) ставили на панелях фирмы “Costar” микрометодом согласно “Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура”, утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.02 г.

Выделение вируса ящура проводили в сформированном монослое первичных и перевиваемых культур клеток в пенициллиновых флаконах или матрасах объемом 50 мл. Учет реакции проводили по цитопатическому действию вируса (ЦПД) каждые 24 часа при общей длительности культивирования 72 часа. Культуральную суспензию исследовали в ИФА на активность и специфичность. ЦПД считали специфичным при выявлении антигена вируса ящура определенного типа.

Постановка ПЦР. Выявление фрагментов генома вируса ящура в пробах продуктов убоя и ПГЖ проводили с использованием полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции РНК вируса ящура. При постановке ПЦР руководствовались “Методическими указаниями по индикации генома вируса ящура с помощью полимеразной цепной реакции на основе амплификации консервативной области 3D гена”, утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ РФ 21.02.1997 г. ПЦР с последующим нуклеотидным секвенированием эпизоотического штамма вируса ящура О №1964/Монголия/2004 проводили с кандидатом биологических наук ФГУ «ВНИИЗЖ» А.В. Щербаковым.

3. Результаты собственных исследований

Отбор проб патологического материала и продуктов убоя. При обследовании туш с неотделенными головами отбирали пробы костного мозга, лимфатических узлов туши и отдельных органов, миндалин и надпочечников, легких, подкожного жира, слизистой оболочки глотки и пищевода, а также языка.

При исследовании полутуш КРС и свиней брали пробы мышцы вместе с соединительной и жировой тканью, трубчатую кость, а также подколенные,

седалишные, надколенные, поверхностные шейные, глубокие паховые, подвздошные, поясничные, почечные, межреберные, грудные лимфатические узлы. От павших и вынужденно убитых животных отбирали лимфоузлы, костный мозг, подкожный жир, надпочечники, легкие и миндалины. слизистые оболочки заглоточной области и языка.

Подготовка проб для осуществления прямой индикации антигена вируса ящура в ИФА. *При изучении эффективности методов очистки* пробы патматериала отбирали через 4 суток после экспериментального заражения КРС вирусом ящура.

Для очистки 10% суспензии патматериала нами был использован хлороформ и фреон-113. Затем материал подвергли ультрафильтрации через фильтры УАМ-300П. Полученные концентраты исследовали в ИФА на наличие антигена вируса ящура.

Наилучшие результаты были получены после очистки фреоном-113, т. к. при применении последнего антиген вируса ящура выявляли в диагностическом титре в 21 пробе патматериала из 27 исследуемых, а после очистки хлороформом только в 9, что говорит о преимуществе данного метода очистки тканевой суспензии. Это объясняется тем, что при очистке фреоном в суспензии тканей и органов разрушается комплекс "антиген-антитело".

Для изучения эффективности методов концентрирования использовали культуральный вирус ящура О₁№194 с титром инфекционности 7,25 lgTCID₅₀/мл. Вирусосодержащую суспензию разводили 1:100, 1:1000 и 1:10000 и затем концентрировали в 100 раз указанными выше методами. Полученные концентрированные пробы культурального вируса исследовали в ИФА на наличие специфического антигена вируса ящура.

Из результатов опыта следует, что в разведении вирусосодержащей суспензии (ВС) 1:100 и 1:1000 антиген вируса ящура выявлен в максимальных титрах при концентрировании ВС через фильтры марки УАМ-300П, Vivacell 100, AMICON, IMMERSIBLE CX-30. При осаждении ПЭГ антиген вируса ящура выявлен только в разведении 1:100. В разведении вирусосодержащей суспензии 1:10000 антиген не выявлен.

В результате было установлено, что концентрирование вирусосодержащей суспензии ультрафильтрацией более эффективно, чем остальными испытываемыми методами. Однако при концентрировании ультрафильтрацией тканевой суспензии недостатком является затрата большого количества времени (6–10 часов) по причине наличия в суспензии балластных белков даже после обработки фреоном-113. Данную проблему удалось решить путем дополнительного осветления тканевой суспензии микрофильтрацией с использованием мембран МФАС-П-4, МФАС-П-3, МФАС-П-2, МФАС-П-1, после дополнительной обработки фреоном-113, и тем самым сократить временные затраты на проведение ультрафильтрации до 30–90 минут. Наибольшее количество проб (6 проб в течение 90 минут) за одинаковый промежуток времени концентрировали с помощью фильтров Vivacell 100.

Таким образом, удалось провести прямую индикацию антигена вируса ящура в продуктах убоя животных без инокуляции культуры клеток СП и в наименее продолжительное время.

Обнаружение возбудителя в различных тканях и органах с применением ПЦР. Для обнаружения возбудителя с помощью ПЦР в максимальном количестве различных органов и тканей исследованию подвергли продукты убоя крупного рогатого скота, полученные через 4 суток после экспериментального заражения вирусом ящура O₁Manisa в слизистую оболочку языка.

Отобранные пробы были заморожены при минус 20°C в течение 1 часа после убоя и хранились при данной температуре до проведения исследований.

Результаты исследования продуктов убоя КРС, полученных через 4 суток после заражения, свидетельствуют о том, что геном вируса ящура обнаруживали в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, языка, лимфоузлов, поджелудочной железы, легких и миндалин. В пробах крови, мышц и надпочечников возбудитель ящура был не выявлен.

Сравнительные исследования продуктов убоя до и после “созревания”. Для изучения возможности выявления генома вируса ящура в ПЦР, антигена в ИФА и вирусовыделения в культуре клеток СП, в продуктах убоя КРС до и

после их “созревания”, исследовали пробы, полученные через 4 суток после заражения животных ящуром, замороженные при минус 20°C в течение 1 часа после убоя и пробы после выдерживания при температуре 2-4°C, в течение 24 часов (созревание).

Полученные результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования продуктов убоя КРС до и после “созревания”, полученных через 4 суток после заражения вирусом ящура
n=3

Патологический материал КРС	Обнаружение генома в ПЦР		Выявление антигена в ИФА		Выделение вируса в КК СП	
	до созревания	после созревания	до созревания	после созревания	до созревания	после созревания
Слизистая оболочка глотки и пищевода	+	+	+	+	+	+
Слизистая оболочка языка	+	+	+	-	+	+
Лимфоузлы	+	+	+	-	+	+
Кровь	-	-	-	-	-	-
Мышцы	-	-	-	-	-	-
Костный мозг	н/и*	н/и	+	+	+	+
Подкожный жир	н/и	н/и	+	+	+	+
Надпочечники	-	-	-	-	-	-
Поджелудочная железа	-	-	-	-	+	-
Легкие	+	+	+	+	+	+
Миндалины	+	+	+	+	+	+

Примечание: + положительно; - отрицательно; * не исследовано

При исследовании проб патматериала, замороженных при минус 20°C в течение 1 часа после убоя и после выдерживания при температуре 2-4°C, количество положительных проб снизилось в ПЦР с 30 до 27, в культуре клеток с 39 до 27, в ИФА с 36 проб до 21, по сравнению с данными, полученными при исследовании проб, замороженных непосредственно после убоя.

В число положительных проб, полученных как при исследовании замороженного материала в течение одного часа после убоя, так и после его созревания, входили пробы лимфоузлов, костного мозга, подкожного жира, слизистых оболочек заглоточной области и языка. миндалин и легких.

Это объяснимо тем, что костный мозг защищен костной тканью, а лимфоузлы – капсулой, которые предохраняют их от смены pH в кислую сторону инактивации и разрушения вируса ящура. В подкожном жире при отсутствии мышечных волокон pH также не меняется. Выявление возбудителя ящура после созревания в слизистой оболочке заглоточной области и языка, миндалинах и легких следует связать с эпителиотропностью вируса, и как следствие этого, его максимальную репродукцию и наличие в данных тканях.

Исследование продуктов убоя после экспериментального заражения животных вирусом ящура типа О №1964/Монголия/2004 С целью обнаружения вируса ящура, его антигена и вирусного генома в продуктах убоя в различные сроки после экспериментального заражения отбирали патматериал от КРС после экспериментального заражения животных вирусом ящура О№1964/Монголия/2004. По причине того, что Монголия, являющаяся одним из экспортеров мяса в Россию, с 2000 года неблагополучна по ящуру типа О, являлось также актуальным изучение иммунобиологических свойств данного эпизоотического штамма.

Исследование свойств эпизоотического штамма вируса ящура типа О.№1964/Монголия/2004. В 2004 году в лаборатории ящура и везикулярных болезней ФГУ «ВНИИЗЖ» из поступившего афтозного материала, полученного на территории Монголии от больного крупного рогатого скота, был выделен вирус ящура типа О, и зарегистрирован под №1964/Монголия/2004.

Возникла необходимость изучить его антигенный спектр по данным РСК с другими штаммами типа О. Результаты представлены в таблице 2.

Анализ результатов, приведенных в таблице 2, показывает, что штамм вируса ящура серологического типа О№1964/Монголия/2004 отличается как от производственных О₁№194 и О₁№1618 (R= 11%), так и от ранее выделенных в Монголии и Тайване эпизоотических штаммов вируса ящура типа О и имеет

наиболее близкое антигенное родство со штаммами, выделенными в Таджикистане в 2001–2002 гг. ($R = 38 - 40\%$).

Таблица 2

**Антигенный спектр вируса ящура О №1964 Монголия/2004
по данным РСК**

Сравниваемые штаммы	Показатели		
	r_1	r_2	R%
О ₁ №194	0,02	0,65	11%
О ₁ №1618	0,02	0,56	11%
О №1734/Приморский	0,02	0,53	10%
О/Тайвань 1/99	0,04	>1.0	20%
О №1736/Грузия/2000	0,02	>1.0	14%
О/Вьетнам 21/99	0,02	>1.0	14%
О №1934/Монголия/2002	0,02	>1.0	14%
О №1922/Таджикистан/2001	0,22	0,66	38%
О №1923/Таджикистан/2002	0,16	1.0	40%

При нуклеотидном секвенировании монгольских изолятов было установлено, что штамм вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004 резко отличается от предшественников (О/Монголия/1735; О/Монголия/1759; О/Монголия/1934) и всех других штаммов, находящихся в коллекции лаборатории ящура и везикулярных болезней ФГУ «ВНИИЗЖ». Степень нуклеотидных различий последовательностей штамма вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004 и российского производственного штамма вируса ящура О₁ №194 составила 14,35%.

Исследование продуктов убоя в различные сроки после заражения. При заражении животных применяли вирус ящура О №1964/Монголия/2004 в виде 10% суспензии афтозного материала, который вводили в слизистую оболочку языка КРС. Убой животных производили через 1, 5 и 8 суток после экспериментального заражения.

При исследовании продуктов убоя, полученных через 1 сутки после экспериментального заражения, возбудитель ящура обнаруживали с помощью ПЦР, ИФА и КК в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, слизистой оболочки языка, заглоточных лимфоузлов и миндалин, а также в пробах поверхностных шейных лимфоузлов и легких. В крови животных выделен

вирус в КК и обнаружен его геном в ПЦР, что связано со стадией виремии и возникновением температурной реакции у животного. При исследовании надколенных лимфоузлов, мышц спины и бедра, костного мозга, подкожного жира, надпочечников и поджелудочной железы нами был получен отрицательный результат.

Из результатов исследований продуктов убоя, полученных через 5 суток после экспериментального заражения, следует, что возбудитель ящура обнаружен в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, слизистой оболочки языка, во всех исследуемых лимфоузлах, легких и миндалинах животных всеми тремя методами. Кроме того, в пробах костного мозга и подкожного жира выделяли вирус ящура в КК и обнаруживали его антиген в ИФА. В пробах поджелудочной железы был выделен вирус и обнаружен вирусный геном в ПЦР. Отрицательный результат в ПЦР, ИФА и КК был получен при исследовании проб крови, надпочечников, мышц спины и бедра.

Из данных, полученных при исследовании продуктов убоя через 8 суток после экспериментального заражения, следует, что геном вируса ящура в ПЦР обнаруживали в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, слизистой оболочки языка, поверхностных шейных, подколенных, надколенных, портальных, заглоточных, подчелюстных лимфоузлов, надпочечников, легких и миндалин животных. Антиген вируса ящура в ИФА выявили только в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, языка, миндалин и легких животных. Вирус ящура в КК выделяли в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, слизистой оболочки языка, подколенных, поверхностных шейных, надколенных, портальных, подчелюстных, заглоточных лимфоузлов, легких и миндалинах животных. Отрицательный результат получен при исследовании проб крови, мышц спины и бедра, костного мозга, подкожного жира и поджелудочной железы.

Таким образом, вирус ящура в КК и вирусный геном в ПЦР обнаруживали во все исследуемые сроки в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, слизистой оболочки языка, лимфоузлов, легких и миндалин, и ни одним из методов не удалось выявить возбудитель ящура в мышечной ткани.

Выявление противоящурных антител в органах и тканях вакцинированных и невакцинированных животных после экспериментального заражения. Для изучения возможности выявления противоящурных антител в различных органах и тканях исследованию в ИФА и РМН подвергли пробы слизистой оболочки глотки и пищевода, языка, лимфоузлов, поджелудочной железы, мышц, костного мозга, надпочечников, легких, подкожного жира, полученные от КРС:

- вакцинированного 1/4 дозы противоящурной вакцины и невакцинированных животных – через 4 суток после экспериментального заражения вирусом ящура типа O₁Manisa;

- вакцинированного цельной дозой и невакцинированного – через 5 суток после заражения вирусом ящура типа O№1964/Монголия 2004;

- вакцинированного цельной дозой и 1/4 дозы и невакцинированных – через 8 суток после заражения вирусом ящура типа O₁Manisa.

На 21 день после вакцинации цельной дозой противоящурной вакцины титры специфических антител в сыворотке крови составляли от 6,5 до 7,5 log₂, после вакцинации 1/4 дозы от 5 до 6,5 log₂. У животных, вакцинированных цельной дозой, а затем контрольно зараженных вирулентным вирусом, в момент убоя наблюдалась местная форма проявления ящура, а у животных, привитых 1/4 дозы и невакцинированных – генерализованная форма ящура.

Через 4 суток после заражения антител к вирусу ящура типа О не обнаружено как у вакцинированных, так и невакцинированных до заражения животных.

Через 5 суток после экспериментального заражения в пробах миндалин и слизистой оболочки глотки и пищевода от невакцинированных и вакцинированных животных обнаружены специфические противоящурные антитела типа О.

Специфические противоящурные антитела типа О выявлены в пробах слизистых оболочек заглоточной области, лимфоузлов, надпочечников, легких и миндалин, отобранных через 8 дней после заражения как от вакцинированных.

так и невакцинированных животных. При этом титр антител в обеих реакциях достигал 5,0-7,0 $\log_2$.

В сыворотке крови титр специфических антител через 4 суток после заражения составлял от 5 до 7 $\log_2$, через 5 суток после заражения от 5 до 10,5 $\log_2$, а через 8 суток от 8 и выше 11 $\log_2$. Данные результаты косвенно указывают на то, что в пробах патматериала обнаружены постинфекционные противоящурные антитела.

Сравнение показателей обнаружения возбудителя ящура и противоящурных антител. На рисунке 1 представлены результаты обнаружения вируса ящура в КК, его антигена в ИФА, вирусного генома в ПЦР и противоящурных антител в продуктах убоя животных, отобранных через 1, 4, 5 и 8 суток после экспериментального заражения.

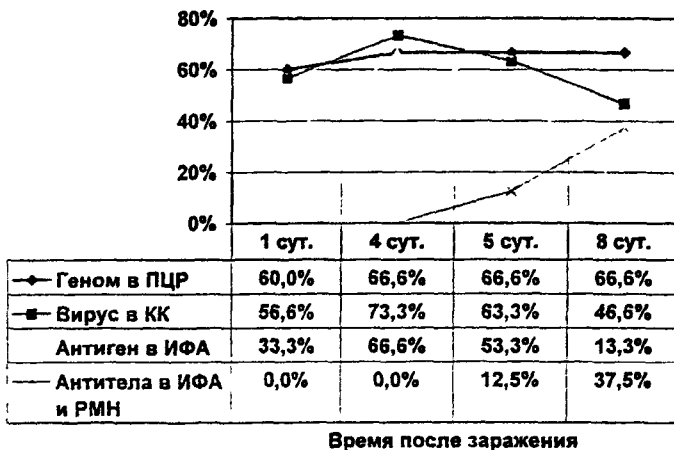


Рис. 1. Результаты обнаружения возбудителя ящура и антител в продуктах убоя в различные сроки после экспериментального заражения животных вирусом ящура

Как следует из рисунка 1, максимальная возможность обнаружения вируса ящура, его антигена и вирусной РНК наблюдается через 4 суток после экспериментального заражения.

Через 5 суток после экспериментального заражения в продуктах убоя удалось выявить антитела (12,5%), а вероятность выделения вируса ящура и обнаружения его антигена снижается.

Через 8 суток наблюдается увеличение количества положительных на антитела проб (37,5%) и снижение возможности выделить вирус ящура и обнаружить его антиген.

Таким образом, при исследовании более 600 проб, в итоговом сравнении положительных результатов, полученных во время проведения опытов по исследованию продуктов убоя животных, установлено, что наиболее высокие и стабильные показатели наблюдались по обнаружению генома вируса ящура. Снижение возможности выявления антигена на 8 сутки после заражения животных вирусом ящура, вероятно, происходит по причине уменьшения концентрации вируса в органах и тканях за счет резкого увеличения титров специфических постинфекционных антител.

При сопоставлении результатов ПЦР и КК установлено, что доля положительных результатов как в ПЦР, так и в культуре клеток составляет 58,3% исследованных проб, отрицательных – 33,3%. Таким образом, результаты 91,6% исследуемых проб совпадают как в ПЦР, так и в культуре клеток.

Результаты исследований продуктов убоя от зараженных вирусом ящура животных с различным иммунным статусом. Для исследования продуктов убоя, полученных от животных с различным иммунным статусом, был отобран патматериал от бычков, экспериментально зараженных вирусом ящура типа O₁Manisa. Отбор материала производили через 4 и 8 суток после заражения контрольных (невакцинированных) животных, а также вакцинированного КРС цельной дозой, 1/4 и 1/8 дозы препарата.

В продуктах убоя животных вакцинированных цельной дозой препарата, в отличие от невакцинированных, существенно меньшее количество положительных проб в ПЦР, КК и ИФА.

Так, через 4 суток после заражения в ПЦР выявлено 73% положительных проб патматериала от невакцинированного животного и 53% проб от вакцинированного цельной дозой. В культуре клеток обнаружено 76%

положительных проб от невакцинированного животного и 41% проб от вакцинированного, в ИФА 70% проб и 29% проб соответственно.

Через 8 суток после экспериментального заражения установлено в ПЦР 66,6% положительных проб от невакцинированного животного и 26,6% проб от вакцинированного цельной дозой препарата животного. В культуре клеток 47% положительных проб и 11,7% проб, в ИФА 17,6% и 0% проб соответственно.

При этом отмечено, что чем меньше доза введенной вакцины, тем выше была возможность обнаружения возбудителя ящура в продуктах убоя с помощью ПЦР, КК и ИФА. Это следует объяснить тем, что репликация вируса в организме зараженных животных блокируется поствакцинальными антителами и чем выше доза вакцины, тем более короткий период времени требуется для выработки антител и для нейтрализации вируса.

Независимо от дозы вакцины, геном вируса ящура в ПЦР у зараженных животных обнаружен в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода, языка, заглоточных лимфоузлов и миндалин, а выделение вируса в КК наблюдалось в пробах слизистой оболочки глотки и пищевода и миндалин.

Индикация возбудителя в продуктах убоя свиней. Для изучения возможности обнаружения возбудителя ящура в продуктах убоя свиней был отобран патматериал через 4 и 8 сутки после экспериментального заражения животных вирусом ящура С₁№564 в слизистую оболочку языка. Результаты исследования полученного материала в ПЦР, ИФА и культуре клеток суммированы в таблице 3.

Из результатов, представленных в таблице 3, следует, что через 4 суток после экспериментального заражения в период максимального развития клинических признаков заболевания при более яркой клинической картине, чем у КРС, возбудитель ящура обнаружен практически во всех исследуемых пробах (в ПЦР 83%, ИФА 73%, КК 80%), за исключением проб мышц и надпочечников.

Тем не менее, при исследовании тканей и органов свиней через 8 суток после заражения, в период угасания клинических признаков заболевания наблюдалось, что антиген вируса ящура в ИФА не обнаружен ни в одной из

исследуемых проб. хотя количество положительных результатов в ПЦР и культуре клеток составляло 42%, что ниже, чем у КРС (66-46%).

Таблица 3

Обнаружение возбудителя ящура в продуктах убоя свиней через 4 и 8 суток после экспериментального заражения вирусом ящура типа С₁№564

n=3

Патологический материал	Обнаружение генома в ПЦР	Выявление антигена в ИФА		Выделение вируса в КК СП		
	дни после заражения					
	4	8	4	8	4	8
Слизистая оболочка глотки и пищевода	+	+	+	-	+	+
Слизистая оболочка языка	+	+	+	-	+	+
Поверхностные шейные лимфоузлы	+	+	+	-	+	+
Подколенные лимфоузлы	+	-	+	-	+	-
Надколенные лимфоузлы	+	+	+	-	+	+
Портальные лимфоузлы	+	-	+	-	+	-
Заглочочные лимфоузлы	+	+	+	-	-	+
Мышцы	-	-	-	-	-	-
Костный мозг	н/и	н/и	+	-	+	-
Подкожный жир	н/и	н/и	+	-	+	-
Надпочечники	-	-	-	-	-	-
Поджелудочная железа	+	-	-	-	+	-
Легкие	+	-	+	-	+	-
Миндалины	+	+	+	-	+	+

Примечание: + положительно; - отрицательно; * не исследовано

В связи с этим в период угасания клинических признаков заболевания вероятность обнаружения возбудителя ящура у свиней ниже, чем у крупного рогатого скота.

Измерение pH в продуктах убоя свиней и температуры проводили в мясе поросят с клиническими признаками ящура через 4 суток после заражения вирусом ящура типа Азия-1/Иран/99, а также через 10 суток после заражения.

при отсутствии клинических признаков болезни. Измерения осуществляли в длиннейшей мышце спины, в холодильной камере, при температуре 2–4°C, с интервалом 2 часа. на протяжении 24 часов, с помощью рН-милливольтметра "рН-410" с термометром и комбинированным электродом "ЭСК-10616/7" с ножевым устройством для измерения рН в мясе и мясопродуктах. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Изменения величины рН и температуры в мясе свинины через 4 и 10 суток после экспериментального заражения животных вирусом ящура

n=3

Показатели	Время после убоя (час.)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
рН через 4 суток	7,0	6,5	6,2	6,0	6,0	5,6	5,5	5,5	5,6	5,8	5,8	6,0	6,0
рН через 10 суток	7,0	6,2	6,0	5,8	5,7	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
t° в мясе	37,0	26,0	19,0	13,5	12,0	10,5	9,0	7,0	6,0	6,0	5,0	5,0	5,0

Примечание: среднестатистическое отклонение величины рН не более $\pm 0,2$.

Из таблицы 4 следует, что у свиней, убитых с клиническими проявлениями ящура, рН в длиннейшей мышце спины составляла ниже 6,0 через 10 часов после убоя, а с 16-18 часов после убоя незначительно повышалась и к 24 часам составляла 6,0. В продуктах убоя свиней без клинических признаков болезни уже через 6-8 часов после убоя значение рН было ниже 6,0, и в период с 10 до 24 часов ее величина составляла 5,5. Наиболее быстрое снижение температуры в мясе происходило в первые 6 часов после убоя и к 24 часам она достигла 5°C.

Таким образом, из полученных результатов следует, что после созревания мяса свинины от клинически здоровых животных значение рН 5,5, а в продуктах убоя клинически больных животных процесс происходит менее активно и величина рН составляет 6,0.

Исследование пищеводно-глоточной жидкости на наличие генома вируса ящура, антигена и противоящурных антител. Пищеводно-глоточную жидкость отбирали у крупного рогатого скота, экспериментально зараженного

вирусом ящура O₁Manisa на 21 сутки после вакцинации цельной дозой. 1/4 и 1/8 дозы противоящурной вакцины. ПГЖ, полученную через 1, 5 и 8 суток после экспериментального заражения, исследовали на наличие антигена вируса ящура в ИФА, его вирусного генома в ПЦР и обнаружение антител в ИФА и РМН.

При исследовании ПГЖ геном вируса ящура был обнаружен в 1 – 8 сутки после экспериментального заражения во всех исследуемых пробах, независимо от иммунного статуса животного. Антиген вируса ящура в пищеводно-глоточной жидкости был выявлен в ИФА с 1 по 5 сутки после экспериментального заражения, из чего следует, что проводить исследование ПГЖ на наличие антигена, без предварительного концентрирования, возможно только в первые сутки после проявления клинических признаков.

В результате исследования ПГЖ наличие специфических противоящурных антител удавалось выявить как в ИФА, так и в РМН уже через 5 суток после экспериментального заражения. Через 8 суток после заражения их обнаруживали обоими методами во всех исследуемых пробах ПГЖ, независимо от иммунного статуса животного.

Соотношение положительных результатов при исследовании ПГЖ в различные сроки после заражения представлено на рисунке 2.

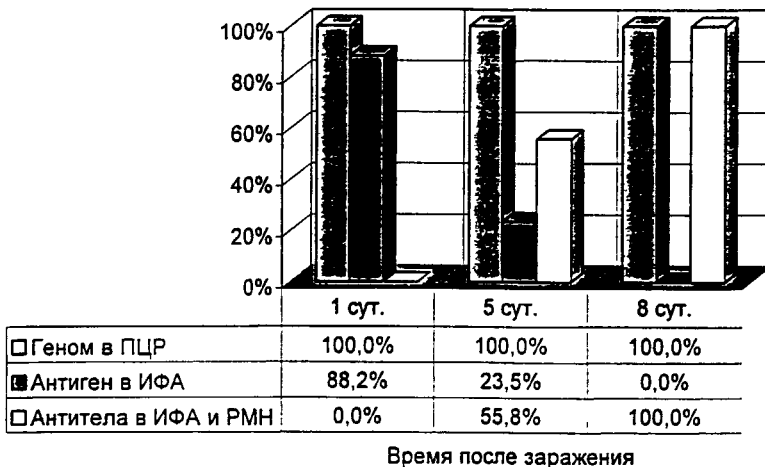


Рис. 2. Обнаружение антигена вируса ящура, вирусного генома и противоящурных антител в ПГЖ

Из данных рисунка 2 следует, что при исследовании проб пищеводно-глоточной жидкости геном вируса ящура обнаруживали в 100% проб во все сроки после экспериментального заражения. Антиген вируса ящура выявляли в 88,2% проб через 1 сутки после экспериментального заражения и в 23,5% проб на 5 сутки. В эти сроки в ПГЖ снижается возможность выявления специфического антигена, но в 55,8% случаев удается обнаружить противоящурные антитела.

Через 8 суток после заражения выявляемость антител в ПГЖ достигает 100% при отсутствии положительных результатов на наличие антигена вируса ящура. Таким образом, при снижении возможности прямой индикации специфического антигена в ПГЖ с помощью иммунохимических реакций появляется вероятность обнаружить противоящурные антитела.

4. Выводы

1. Установлена возможность обнаружения генома вируса ящура в тканях и органах животных с помощью ПЦР и показано, что данный метод более чувствительный, чем прямая индикация антигена вируса ящура в ИФА и вирусовыделение с использованием культур клеток.

2. Показано, что для прямой индикации антигена вируса ящура без предварительной постановки биопробы могут быть использованы концентрированные методом ультрафильтрации суспензии из тканей и органов животных.

3. Положительные результаты исследований органов и тканей в ИФА и ПЦР на наличие антигена вируса ящура и вирусного генома свидетельствуют, что пробы получены от больных или переболевших ящуром животных.

4. Определена возможность обнаружения противоящурных антител с помощью ИФА и РМН в продуктах убоя животных. Антитела выявляли только после заражения как интактных, так и предварительно иммунизированных животных.

5. Установлено, что при положительных результатах анализа органов и тканей на наличие противоящурных антител, в том числе без подтверждения

результатами анализа на вирусный антиген или геном вируса ящура, продукты убоя, полученные от невакцинированных животных, должны считаться потенциально опасными в распространении ящура.

6. Показано, что для лабораторной индикации возбудителя ящура и противоящурных антител в пробах патологического материала и продуктах убоя животных целесообразно использовать следующие органы и ткани: слизистые оболочки глотки, языка и пищевода, легкие, надпочечники, миндалины, лимфатические узлы.

7. В процессе исследования продуктов убоя после заражения животных эпизоотическим штаммом О№1964/Монголия/2004 также были изучены его свойства и установлено, что этот штамм отличается от производственного штамма О₁№194 и степень нуклеотидных различий между ними составляет 14,35%. Изучение антигенного спектра штамма вируса ящура типа О№1964/Монголия/2004 в РСК показало, что он отличается от производственных штаммов О₁№194 и О₁№1618 ($R=11\%$) и ранее установленных эпизоотических штаммов вируса ящура типа О, но более близок к штамму, выделенному в Таджикистане в 2001 – 2002 гг. ($R=38-40\%$).

8. Полученные результаты по изучению свойств эпизоотического штамма вируса ящура типа О№1964/Монголия/2004 дают основание предложить этот штамм в качестве нового производственного для приготовления вакцинных и диагностических препаратов.

9. Установлено, что пищеводно-глоточная жидкость пригодна для исследований методами ПЦР, ИФА и РМН для выявления генома вируса ящура, антигена, противоящурных антител и прижизненного установления факта переболевания животных ящуром.

5. Практические предложения

Полученные результаты использованы при подготовке следующих документов, одобренных ученым советом и утвержденных директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»:

1. "Методические указания по отбору, консервированию и транспортировке проб патологического материала и продуктов убоя для лабораторной диагностики ящура" (утверждены 29.09.2005 г.).
2. "Методические указания по исследованию продуктов убоя животных при подозрении на ящур" (утверждены 02.06.2005 г.).
3. Штамм вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004, который в антигенном отношении отличается от производственных штаммов (О₁№194, О₁№1618) и депонирован в ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (2004г.).
4. "Правила профилактики и ликвидации ящура животных" (приложение «О порядке сбора, консервирования и доставки материалов для лабораторной диагностики ящура», одобрены ученым советом и находятся на рассмотрении в Россельхознадзоре МСХ РФ).
5. "Программа совместных действий государств - участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах Содружества" (дополнение в раздел 5.2. «Основные мероприятия на 2006-2008 гг.», одобрены Россельхознадзором МСХ РФ, представлены на 29-е заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ 19 апреля 2006 г., г.Ташкент, Республика Узбекистан).

6. Список опубликованных научных работ

1. Никифоров В.В, Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Фомина Т.А., Егорова А.И., Пономарев А.П. Выявление антигена вируса ящура в продуктах убоя животных // Актуальн. проблемы инфекц. патологии жив-х: Матер. Междунар. науч. конф., посвящён. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2003.- С. 14-18.

2. Захаров В.М., Рахманов А.М., Фомина Т.А., Герасимов В.Н., Камалова Н.Е., Кременчугская С.Р., Караулов А.К., Муминов Д.М., Никифоров В.В., Патрикеев В.Г., Фомина С.Н. Результаты эпизоотологического и серологического мониторинга по ящуру в России в 2002г. // Актуальн. вопр. зоотех. науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и

здоровья с.-х. жив.-х: Матер. 2-й Междунар. науч.-практ. конф. – Ставрополь, 2003. – С.313-317.

3. Никифоров В.В., Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Фомина Т.А., Егорова А.И., Пономарев А.П. Сравнительная оценка методов концентрирования вирусосодержащей суспензии для выявления антигена вируса ящура в продуктах убоя животных // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: Матер. конф. – Владимир, 2004. – С. 12 – 15.

4. Никифоров В.В., Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Фомина Т.А., Муминов Д.М., Малкова К.С. Результаты исследования продуктов убоя КРС, экспериментально зараженного ящуром // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2005. - Т.3. - С. 80-84.

5. Фомина Т.А., Спирин В.К., Егорова А.И., Щербаков А.В., Муминов Д.М., Никифоров В.В. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О №1964/Монголия /2004 // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2005. - Т.3. - С. 58-65.

2006A
14248

N^o 14. 2 4 8