

На правах рукописи



00345 1825

ЖИЛЬЦОВА Милена Владимировна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ

ВИРУСА ЯЩУРА ТИПОВ А, О И АЗИЯ-1

16.00.03 «Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология»

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

0 ОКТ 2008
(Handwritten signature)

Владимир – 2008

Работа выполнена в федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук,
КРЕМЕНЧУТСКАЯ
Светлана Ревдитовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
ЕРЕМЕЦ Владимир Иванович

доктор ветеринарных наук, профессор
БАЙБИКОВ Тауфик Закарьевич

Ведущая организация ФГУ «Всероссийский
государственный Центр
качества и стандартизации
лекарственных средств для животных
и кормов» (ФГУ «ВГНКИ», г. Москва)

Защита диссертации состоится «18» ноября 2008 г. в 10 часов на
заседании диссертационного совета по защите докторских и кандидатских
диссертаций Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных».

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

Автореферат разослан «15» октября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

 Г.М. Семенова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ящур относится к числу наиболее опасных инфекционных болезней, способных быстро распространяться на огромные территории, наносящих животноводству значительный экономический ущерб. При ящуре в молочном и мясном животноводстве доходы могут снижаться на 35-40%. Кроме того, значительный урон наносит гибель молодняка животных (А.А. Бойко, Б.А. Кругликов 1994; А.А. Гусев и др., 2001; В.М. Захаров и др., 2002). Высокая контагиозность болезни, широкий спектр восприимчивых животных, множество иммунологических типов и подтипов возбудителя, разнообразие путей его выделения и распространения, способность длительное время сохраняться как во внешней среде, так и в организме животных, создают трудности в ликвидации этой болезни и требуют больших финансовых затрат. Карантинные меры по ликвидации ящура нарушают нормальную хозяйственно-экономическую деятельность сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий, затрагивают общественные, экономические и межгосударственные связи (В.М. Авилов, 1997; В.М. Захаров и др., 2003).

Широкое распространение ящура, равно как и сложности, возникающие при диагностике и подборе вакцинных штаммов, обусловлено высокой мутационной изменчивостью генома и антигенным разнообразием вируса ящура (В. Л. Узюмов, 1970; E. Domingo et al., 2003).

Определенные участки капсидных белков вириона, образующих антигенные детерминанты, отличаются значительной вариабельностью. Это свойство позволяет вирусу связываться с рецепторами новых типов клеток. Такой механизм обеспечивает быструю адаптацию вируса ящура (ВЯ) в различных условиях и позволяет ему развиваться на широком круге хозяев (А.В. Щербаков, 1996; T. Fomina, et al., 2001; P.W. Mason et al., 2003; F. Brown, 2003). Эта способность вируса к антигенной вариабельности используется в эпизоотологических исследованиях для его характеристики и

определения происхождения эпизоотического изолята (R.P. Kitching et al., 1998; В.Н. Данилюк, 1994).

Сдвиги антигенного спектра, соответствующие обновлению структуры нового полевого штамма, могут варьировать от незначительных до существенных. Существенные изменения антигенных характеристик природного штамма создают сложности при проведении вакцинации, поскольку вакцина, приготовленная из гетерологичного штамма не всегда способна обеспечивать должный уровень защиты. (А.С. Яковлева и др., 2006; А.В. Щербаков и др., 2005; А.М. Рахманов и др., 1995; A.R. Samuel et al., 1990). Одной из важнейших составляющих решения этой проблемы является всестороннее изучение вновь выделяемых изолятов вируса ящура и сравнение их с ранее выделенными и производственными штаммами.

В связи с этим, было необходимо провести сравнение эпизоотических изолятов с производственными штаммами, используемыми при производстве противоящурных вакцин, а также изучение иммунобиологических свойств выделенных изолятов и лабораторных штаммов вируса ящура типов А, О, и Азия-1.

Цель и задачи научных исследований. Целью наших исследований было изучение биологических свойств лабораторных штаммов и эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О, и Азия-1, выделенных в процессе возникновения эпизоотий в различных регионах, а также сравнение эпизоотических изолятов с производственными штаммами, используемыми при изготовлении противоящурных вакцин.

В соответствии с этим необходимо было решить следующие задачи:

1. Оптимизировать методику постановки реакции микронейтрализации (PMH) для определения антигенного соответствия между производственными штаммами вируса ящура и эпизоотическими изолятами.

2. Создать банк сывороток крови вакцинированных животных, содержащих антитела к производственным штаммам вируса ящура, для

использования в РМН при определении антигенного соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам.

3. Изучить способность к репродукции в различных клеточных культурах изолятов и штаммов ВЯ типов А, О и Азия-1 и их бляшкообразующие свойства, а также чувствительность лабораторных и естественно-восприимчивых животных к эпизоотическим изолятам ВЯ типов А, О и Азия-1.

4. Определить в РМН антигенное соответствие эпизоотических изолятов вируса ящура, выделенных в различных регионах, производственным штаммам.

5. Установить двустороннее антигенное родство различных штаммов вируса ящура типов А и Азия-1 в реакции связывания комплемента (РСК).

Научная новизна заключается в широком изучении иммунобиологических свойств различных лабораторных штаммов и эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О и Азия-1.

- Изучена способность к репродукции в различных клеточных линиях и бляшкообразующая способность 10 лабораторных штаммов и 18 эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О и Азия-1, полученных из различных регионов с 2005 по 2007гг.
- Определена чувствительность лабораторных и естественно-восприимчивых животных к заражению изолятами вируса ящура типов А, О, и Азия-1, полученными из различных регионов с 2005 по 2007гг.
- Изучено двустороннее антигенное родство вируса ящура типов А и Азия-1, выделенных в различных регионах с 2005 по 2007гг.
- Оптимизирована методика постановки РМН для определения антигенного соответствия производственных штаммов эпизоотическим изолятам вируса ящура.
- Определено антигенное соответствие в РМН эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О, Азия-1 и производственных штаммов вируса, используемых при изготовлении противоящурных вакцин.

Практическое значение работы. На основании проведенных экспериментальных исследований определено антигенное соответствие эпизоотических изолятов, выделенных с 2005 по 2007 гг. в различных регионах, производственным штаммам вируса ящура типов А, О и Азия-1.

Штамм вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 после изучения иммунобиологических свойств был депонирован 16 мая 2006 г. во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ «ВГНКИ»).

Материалы диссертационной работы использованы при составлении заявки № 2007112591/13(013661) от 04.04.2007 г. на выдачу патента РФ на изобретение «Штамм “Амурский” №1987 вируса ящура типа Азия-1 для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики ящура типа Азия-1, диагностики, контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин».

Создан банк сывороток крови КРС, иммунизированного моновалентными противоящурными вакцинами против типов ВЯ А, О, Азия-1, для определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам вируса ящура в РМН.

На основании проведенной работы разработаны и внедрены в производственную практику «Методические указания по определению антигенного соответствия между производственными штаммами вируса ящура и эпизоотическими изолятами в реакции микронеutralизации», одобренные ученым советом и утвержденные директором ФГУ «ВНИИЗЖ» (08.02.2008).

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на Международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ», на конференции молодых ученых, посвященной проблемам мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных (Владимир, 24-26 марта 2004 г.), на конкурсе научных работ молодых ученых ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

(ФГУ «ВНИИЗЖ»), (Владимир, 2008г.) а так же на заседаниях ученого совета в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»), (г. Владимир, в 2003-2007 гг.).

Публикации результатов. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, 4 из которых – в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ.

Основные положения, выносимые на защиту

- характеристика репродуктивных и бляшкообразующих свойств эпизоотических изолятов и лабораторных штаммов вируса ящура типов А, О и Азия-1;

- особенности репродукции эпизоотических изолятов вируса ящура типа А, О, Азия-1 на естественно-восприимчивых и лабораторных животных;

- результаты определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О и Азия-1 вакцинным штаммам в реакции микронейтрализации;

- результаты установления двустороннего антигенного родства эпизоотических изолятов вируса ящура в реакции связывания комплемента.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 189 источников, из них 124 отечественных и 65 иностранных. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 7 рисунками.

Личный вклад. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы работы по проведению ПЦР, секвенированию эпизоотических изолятов и определению наличия антител к неструктурному полипептиду 3А в сыворотках крови экспериментально зараженных животных проводились совместно с к.б.н. А.В. Щербаковым. Опыты на КРС, МРС и свиньях были проведены совместно с сотрудниками лаборатории «Биотехнологии» и руководителем отдела биологического и технологического контроля д.в.н. В.И. Диевым.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.в.н. Кременчугской С.Р. за помощь при выполнении и оформлении диссертационной работы, а также сотрудникам лабораторий «Ящура и везикулярных болезней», «Биотехнологии», «Диагностики особо опасных болезней животных», Отделу биологического и технологического контроля и научной библиотеке за поддержку, практическую помощь и методические советы при выполнении и оформлении диссертации.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Материалы и методы

Эпизоотические изоляты и штаммы вируса ящура. В работе использовали штаммы и изоляты вируса ящура следующих типов:

Вирус ящура типа О: О₁ №194 /афтозный; О₁ №194 /овечий; О₁ №194 /мышиний. О₁ №1618 /лапинизированный; О Тайвань 3/97; О Индия 53/79; О₁ Маниса; О №1685 /Московский/1995; О №1734 /Приморский/2000; О №1759 /Монголия/2001; О Казахстан/2007; О Киргизия 1/2007; О Киргизия 2/2007; О Нагорный Карабах/2007;

Вирус ящура типа А: А₂₂ №550/Азербайджан/64; А №1707/Армения/98, лабораторные варианты А₂₂ №550/II и А₂₂ №550/4-10; А₂₂ №550 овечий; А Ирак 24/64; А /Турция/726/2006; А /Турция/738/2006; А /Турция/969/2006; А /Турция/957/2006; А Иран 4/05; А Иран 5/05;

Вирус ящура типа Азия-1: Азия-1 №1987/Амурский/2005; Азия-1 №1991/Монголия/2005; Азия-1 №1994/Приморский/2005; Азия-1 №2002/Читинский/2006; Азия-1 №2003 Читинский/2006; Азия-1 Шамир 3/89.

Специфические противоящурные сыворотки крови КРС. В работе использовали сыворотки крови КРС, отобранные у животных через 21-28 сут после вакцинации моновалентными вакцинами против ВЯ типа А₂₂ №550; А₂₂ Ирак 24/64; О №1734; Азия-1 Шамир 3/89, а также сыворотки крови КРС, полученные после вакцинации трехвалентной вакциной А, О №1618, Азия-1.

Культуры клеток. В работе использовали следующие культуры клеток (КК): СП, IB-RS-2, ПСГК-30, ПТ, ПК, МДВК, КГ-91, ВНК-21, КСТ, RSK, Taurus и СПЭВ.

Питательные среды и солевые растворы. В опытах были использованы среды и растворы: Игла, 199, ПСС, ПСП, ГЛА на растворе Эрла, ГЛА на растворе Хенкса, ГЛА на растворе Эрла с двойным набором солей, 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор версена, фосфатно-буферный раствор (ФБР) 1/15 М.

Животные. Опыты проводились на морских свинках, массой 300-400 г, крупном рогатом скоте в возрасте 18-24 мес, разновозрастных козах, овцах трехлетнего возраста и поросятах массой не менее 40 кг в возрасте 5-6 мес.

Подготовка афтозной суспензии. Афтозный патматериал измельчали и готовили 10% и 33% суспензии на ФБР и экстрагировали при комнатной температуре в течение 40 мин. После этого суспензию подвергали замораживанию с последующим оттаиванием. Затем её очищали добавлением хлороформа, 8-10% от общего объема и подвергали центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15-20 мин.

Вирусовыделение и репродукция вируса ящура в монослойных клеточных культурах. Культивирование вируса проводили в стеклянных и пластиковых сосудах (матрасах) емкостью 50 и 1500 мл с полностью сформированным монослоем. Инкубировали инфицированную клеточную культуру при температуре 37 °С до дегенерации 80-100% клеток монослоя, но не более 120 часов.

Реакция микронейтрализации (РМН). С помощью реакции микронейтрализации определяли титры противоящурных антител, в сыворотках крови животных, а также антигенное соответствие эпизоотических изолятов вакцинным штаммам. Реакцию ставили на планшетах фирмы «Costar» микрометодом с использованием КК IB-RS-2 согласно «Методике выявления антител к вирусам ящура и везикулярных болезней в реакции нейтрализации на микропанелях», утвержденной

директором ВНИИЗЖ в 1996 г. Для определения показателя r_1 (антигенное соответствие) использовали «Методические указания по определению антигенного соответствия между производственными штаммами вируса ящура и эпизоотическими изолятами в реакции микронейтрализации» (2007г.).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Титры специфических противоящурных антител в сыворотках крови животных определяли в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА согласно «Наставлению по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в ИФА» утвержденному руководителем Департамента ветеринарии Минсельхоза России (2004 г.).

Определение инфекционной активности вируса. Титрование ВЯ осуществляли на высокочувствительных первичных и перевиваемых клеточных культурах СП, КСТ, IB-RS-2, а также на естественно-восприимчивых и лабораторных животных по общепринятым методикам.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура методом бляшек под агаровым покрытием. Применяли КК свиного происхождения (КСТ, ПСГК-30 и IB-RS-2). Использовали по 4 флакона емкостью 50 мл с клеточной культурой на одно разведение, куда вносили по 0,1 мл вирусной суспензии и помещали в термостат при температуре 37°C на 1 час. Затем во флаконы вносили по 10 мл агаровой среды-покрытия и инкубировали монослоем вверх при температуре 37 °C в течение 72 часов. Подсчитывали количество образовавшихся негативных колоний, видимых на окрашенном кристаллвиолетом монослое в виде обесцвеченных фокусов.

Определение титра инфекционной активности вируса микрометодом. Определение титра инфекционности вируса в вируссодержащем материале проводили микрометодом в культуральных 96-луночных планшетах в КК IB-RS-2. Разведения вируса добавляли в лунки культурального планшета, с предварительно внесенной средой Игла с антибиотиками (50 μ l). Затем во все лунки вносили по 50 μ l клеточной

суспензии с концентрацией $0,8-1,0 \times 10^{6,0}$ кл/мл. Планшет инкубировали при температуре 37°C и 5% CO_2 в течение 48 ч. Титр вируса выражали в $\text{lg TЦД}_{50}/50\mu\text{l}$.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура в КК СП. Проводили на пенициллиновых флаконах с полностью сформировавшимся монослоем КК СП. Последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала вносили по 1,0 мл в пенициллиновые флаконы с клеточной культурой и помещали в термостат при температуре 37°C для инкубации в течение 72 ч. Титр вируса выражали в $\text{lg TЦД}_{50}/\text{мл}$.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура на морских свинках. При титровании афтозного вируса на морских свинках готовили десятикратные разведения на ФБР. На каждое разведение использовали по 4-5 морских свинок. Вирусную суспензию вводили в объеме 0,1 мл в правую заднюю лапку интраплантарно методом туннелирования. Генерализацией инфекционного процесса считали наличие афт хотя бы на одной из 3-х конечностей, в которые вирус не вводили.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура по методу Гендерсона. Инфекционность вируса ящура по методу Гендерсона определяли на КРС. Клинически здоровым неиммунным животным в возрасте 16-18 мес. в слизистую оболочку языка вводили последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала на ФБР – в 5 точек по 0,1 мл. Учет титрования проводили через 24 часа. Титр инфекционной активности вируса рассчитывали по методу Кербера и выражали в $\text{lg ИД}_{50}/0,1\text{мл}$.

Получение гипериммунных сывороток. Согласно опубликованным данным В.К. Спирина и соавт. (1987) были получены гипериммунные сыворотки морских свинок. Здоровых морских свинок иммунизировали трёхкратно с интервалом 21 и 7 сут антигеном, представляющим собой концентрированный инактивированный вирус ящура с добавлением равного количества масляного адьюванта типа неполного адьюванта Фрейнда. Морских

свинок обескровливали на 10 сутки после последней иммунизации. Полученные сыворотки проверяли индивидуально в РСК, а затем объединяли и использовали для постановки РСК при определении двустороннего антигенного родства (R%).

Заражение естественно-восприимчивых животных.

Чувствительность естественно-восприимчивых животных изучали методом интрадермолингвального заражения. Для этого 33% суспензию афтозного материала вводили в 4-8 точек языка, в объеме 1,0 мл на животное для МРС, 8-10 мл 10% суспензии для КРС и по 0,5 мл 10% суспензии – пороссятам. Учитывали сроки появления клинических признаков заболевания.

Заражение лабораторных животных. Морских свинок заражали 10% вируссодержащей суспензией по 0,1-0,5 мл в плантарную поверхность задних лапок методом туннелирования. Наблюдения за зараженными животными вели в течение 7 дней, отмечали появление и созревание афт, а так же сроки наступления генерализации инфекционного процесса.

При проведении всех исследований, кроме опытов на естественно-восприимчивых животных количество опытов было равно трем или более трёх ($n \geq 3$).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение биологических свойств вируса ящура типа А

Репродуктивные свойства лабораторных вариантов вируса ящура типа А₂₂ №550. При изучении способности к репродукции в клеточных культурах лабораторных вариантов ВЯ типа А₂₂ №550 было установлено, что они активно реплицировались в перевиваемых клеточных культурах КСТ, IB-RS-2 и ВНК-21. Уже к 2-4 пассажу вирус имел инфекционную активность $5,5 \pm 0,09 - 8,5 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. В то же время для их адаптации к первичным культурам клеток ПТ и СП требовалось большее количество пассажей (от 4 до 7), а титр инфекционной активности вируса составлял $5,5 \pm 0,11 - 6,5 \pm 0,07$ и $4,0 \pm 0,01 - 4,5 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ соответственно.

При преобладании в монослое субкультуры ПТ фибробластоподобных клеток специфическое ЦПД не отмечали в течение 96 часов, в то время как в монослое с преобладанием клеток эпителиального типа наблюдали 80-100% ЦПД в первые сутки после заражения культуральным ВЯ типа А₂₂№ 550. Таким образом, применять субкультуру ПТ в дальнейших опытах для оценки репродуктивной способности вируса ящура было нецелесообразно.

Бляшкообразующие свойства лабораторных вариантов вируса ящура типа А₂₂ №550. Титр референтного вируса ящура типа А₂₂ №550 и его вариантов, размноженных в КК СП, при его определении методом бляшек в КК КСТ и IB-RS-2 был равен или выше, чем титр вируса, определенный в КК СП по ТЦД. В то же время титр варианта вируса ящура А₂₂ №550/4-10, репродуцированного в КК IB-RS-2, при титровании методом бляшек в КК КСТ и IB-RS-2 был ниже, чем титр вируса по ТЦД (7,25±0,11 lg ТЦД₅₀/мл, 6,54±0,30 и 5,18±0,70 lg БОЕ/мл соответственно).

Вариант вируса ящура типа А₂₂ №550/4-10 в КК КСТ и IB-RS-2 образовывал бляшки более однородные по размеру, чем вирус ящура типа А₂₂ №550 вариант II и А₂₂ №550 исходный. При этом отмечали, что лабораторный вариант ВЯ А₂₂ №550 /II образовывал от 30 до 42% крупных бляшек, размер которых был более 5мм и приблизительно такое же количество мелких, размером от 1 до 3 мм.

Репродуктивные свойства эпизоотических изолятов вируса ящура типа А. Эпизоотические изоляты ВЯ типа А активно репродуцировались в КК ПСГК-30, IB-RS-2 и СП. При этом титры инфекционной активности наиболее высокими были у изолятов, репродуцированных в КК ПСГК-30, и составляли 6,17±0,08 и 6,50±0,0 lg ТЦД₅₀/мл для изолятов ВЯ типа А Турция/726/06 и А Турция/738/06. Следует отметить, что изолят вируса ящура типа А Турция 726/06 при репродукции во всех клеточных культурах имел наиболее высокие титры инфекционной активности: от 6,00±0,03 lgТЦД₅₀/мл в образцах, размноженных в КК СП, до 6,52±0,22 lgТЦД₅₀/мл – в КК IB-RS-2. В то же время изолят А Турция 957/06 накапливался во всех используемых КК в наименьших титрах: от 3,52±0,14 lgТЦД₅₀/мл в КК СП до

5,5±0,15 lgТЦД₅₀/мл в КК ПСГК-30. Изоляты вируса ящура типа А Иран 4/05 и А Иран 5/05 активно размножались как в первично-трипсинизированной КК СП, так и в перевиваемых клеточных линиях. Наиболее высокими титры инфекционной активности были у изолятов вируса А Иран 4/05 и А Иран 5/05, прошедших 2-3 пассажа в КК ПСГК-30, которые составляли 7,3±0,20 lgТЦД₅₀/мл и 7,0±0,10 lgТЦД₅₀/мл соответственно.

При определении инфекционной активности изолятов микрометодом в клеточной культуре IB-RS-2 существенной разницы в титрах вируса, реплицированного в КК ПСГК-30 и IB-RS-2, установить не удалось.

Чувствительность лабораторных животных к вирусу ящура типа А/Турция/06. У морских свинок ВЯ типа А Турция/06 вызывал появление первичных афт на месте инокуляции вирусной суспензии через 56 часов в первом пассаже. При этом генерализацию инфекционного процесса у животных отмечали уже во втором пассаже через 7 суток, а к 6 пассажу генерализацию обнаруживали через 120 часов после заражения.

Чувствительность естественно-восприимчивых животных к вирусу ящура генетической линии А Иран/05. Было установлено, что изоляты вируса ящура типа А Иран 4/05 и А Турция 726/06, принадлежащие к генетической линии А Иран/05, являются патогенными для КРС и при экспериментальном заражении вызывают образование афт на месте введения через 24-28 часов. Также было установлено, что уже в первом пассаже ВЯ типа А Иран 4/05 через 30-47 часов после заражения свиней вызывает образование афт.

Антигенное соответствие эпизоотических изолятов вируса ящура генетической линии А Иран/05 производственным штаммам вируса ящура типа А в реакции микронейтрализации. Полевые изоляты, принадлежащие к линии А Иран/05, антигенно отличались от производственного штамма вируса ящура типа А₂₂ №550, так как все показатели r_1 были <0,3, что было подтверждено результатами контрольного заражения животных. В то же время изучаемые изоляты, по результатам реакции микронейтрализации антигенно родственны производственному штамму вируса ящура А₂₂ Ирак 24/64 ($r_1 = 0,49-1,0$), за исключением изолята

А Турция 969/06 ($r_1 = 0,26$). Кроме того, все изоляты по результатам исследования в реакции микронеutralизации оказались антигенно подобны штамму А/Турция 726/2006, который использовался для приготовления экспериментальной моновалентной вакцины. Показатель r_1 изолятов линии А Иран/05 и штамма ВЯ типа А Турция/06 составлял 0,35-1,0 (табл. 1).

Таблица 1

**Результаты определения антигенного соответствия (r_1)
производственных штаммов и эпизоотических изолятов вируса ящура
типа А в реакции микронеutralизации**

Эпизоотические изоляты	Сыворотка крови вакцинированного КРС, r_1		
	А ₂₂ №550	А ₂₂ Ирак 24/64	А Турция 726/06
А Турция 726/06	0,09	0,49	1,0
А Турция 738/06	0,15	0,67	0,7
А Турция 969/06	0,10	0,26	0,7
А Турция 957/06	0,20	0,71	1,0
А Иран 4/05	0,14	0,61	1,0
А Иран 5/05	0,17	0,78	1,0

Двустороннее антигенное родство вируса ящура типа А/Турция/06 в реакции связывания комплемента. Изоляты А Турция/06 и А Иран/05 являются антигенно близкородственными, поскольку их антигенное родство, установленное в РСК, составляло 70%. В то же время изолят А Турция/06 сильно отличается от производственных штаммов вируса ящура А₂₂ №550 Азербайджан/64 и А №1707/Армения/98, так как степень их родства составляет 13 и 10% соответственно. Изоляты вируса ящура типа А Турция/06 и производственный штамм А₂₂ Ирак 24/64 имеют антигенное родство равное 32% и следовательно могут быть отнесены к разным подтипам (табл. 2).

Таблица 2

**Показатели двустороннего антигенного родства эпизоотического
изолята вируса ящура типа А/Турция/06**

Сравниваемые штаммы вируса ящура	Антигенное родство с А/Турция/06		
	r_1	r_2	R%
А ₂₂ №550 Азербайджан/64	0,025	0,81	13
А Иран/05	0,5	1,0	70
А ₂₂ Ирак 24/64	0,42	0,23	32
А №1707/Армения/98	0,035	0,27	10

**Изучение биологических свойств производственных штаммов и
эпизоотических изолятов вируса ящура типа О**

Репродуктивные свойства лабораторных штаммов вируса ящура типа О₁ №194. Штаммы вируса ящура типа О₁ №194/овечий и О₁ №194/мышинный в течение проведенных 2 и 5 пассажей в КК СП не показали увеличения титра инфекционной активности вируса. Также не наблюдалось изменения титра при репродукции в КК КСТ штамма ВЯ О₁ №194/лапинизированный, где титр и в первом, и во втором пассаже, составил $6,0-6,04 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, несмотря на проявление 100% ЦПД через 18-20 часов после заражения клеточной культуры.

В КК ВНК-21 и IB-RS-2 на 3-5 пассаже отмечали 100% ЦПД у всех исследуемых штаммов ВЯ типа О. При этом титр вируса увеличивался к последнему пассажу в среднем на 2-3 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Однако при репродуцировании ВЯ О₁ №194/мышинный в перевиваемой клеточной линии ВНК-21 наблюдали снижение титра вируса с $5,52 \pm 0,25$ до $4,50 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вероятно, это было связано с репродуктивными особенностями данного штамма.

Бляшкообразующие свойства лабораторных штаммов вируса ящура типа О₁ №194. Титры инфекционности ВЯ типа О №194/овечий и О₁ №194/мышинный, определенные как в КК СП, так и методом бляшек под агаровым покрытием, значительно не различались. Титры определенные в КК СП, составили $7,50 \pm 0,25$ и $5,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ соответственно. При определении инфекционной активности тех же вирусосодержащих суспензий в $\lg \text{БОЕ}$ в КК КСТ и IB-RS-2 титры были $7,9 \pm 0,21 \lg \text{БОЕ}/\text{мл}$ и $6,6 \pm 0,16 \lg \text{БОЕ}_{50}/\text{мл}$ соответственно. Таким образом, титр инфекционности вируса ящура типа О₁ №194, выраженный в логарифмах $\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, был несколько ниже, чем в БОЕ.

Репродуктивные свойства эпизоотических изолятов вируса ящура типа О. Изолят ВЯ О №1759/Монгольский/2001, адаптировался к КК СП, ВНК-21, КСТ и IB-RS-2 на 5-6 пассаже. При этом в КК ВНК-21 титр

инфекционной активности к 6 пассажиру не увеличивался по сравнению с первым пассажиром, и его величина составила от $2,50 \pm 0,23$ до $2,00 \pm 0,25$ Ig ТЦД₅₀/мл. В КК СП, КСТ и IB-RS-2 было отмечено возрастание титра по сравнению с первым пассажиром на 1,5-2,5 Ig.

Титр инфекционной активности ВЯ типа О₁ №1685/Московский/1995 в КК КСТ уже в первом пассаже был $6,25 \pm 0,14$ Ig ТЦД₅₀/мл и возрастал ко второму пассажиру до $7,50 \pm 0,08$ Ig ТЦД₅₀/мл. При репродукции того же изолята в КК СП на первом пассаже титр инфекционной активности составлял $4,33 \pm 0,22$ Ig ТЦД₅₀/мл, а к третьему пассажиру наблюдали его снижение до $3,75 \pm 0,13$ Ig ТЦД₅₀/мл. При этом 100% ЦПД наступало не раньше 24-28 ч после заражения КК.

В ходе репродукции ВЯ О₁ №1734/Приморский/2000 наиболее значительное увеличение титра наблюдали в КК СП от $0,75 \pm 0,25$ до $6,25 \pm 0,22$ Ig ТЦД₅₀/мл и в IB-RS-2 от $2,25 \pm 0,25$ до $7,25 \pm 0,25$ Ig ТЦД₅₀/мл.

Бляшкообразующие свойства эпизоотического изолята вируса ящура типа О №1685/Московский /1995. Титры инфекционной активности, определенные методом бляшек под агаровым покрытием, оказались несколько ниже титров, определенных на КК СП: $7,50 \pm 0,08$ Ig ТЦД₅₀/мл и $5,7 \pm 0,12$ Ig БОЕ/мл для ВЯ О №1685/Московский /1995, прошедшего 2 пассажира в КК КСТ. Кроме того, в КК КСТ вирус образовывал в основном крупные бляшки при отсутствии мелких (менее 3 мм), тогда как на КК IB-RS-2 образовывались бляшки всех размеров, но основная часть негативных колоний была среднего (3-6 мм) и мелкого (1-3 мм) размера. Так же необходимо отметить, что эпизоотический изолят ВЯ типа О №1685/Московский /1995 давал бляшки более разнородные по размеру, чем лабораторные штаммы ВЯ типа О.

Чувствительность лабораторных животных к вирусу ящура типа О Тайвань 3/97. Выраженные афты у морских свинок после введения ВЯ типа О Тайвань 3/97 обнаруживали только к 68-70 часу и генерализацию процесса наблюдали у двух животных из трех инфицированных. К

четвертому пассажиру полное созревание афт отмечали уже на 20-21 час после введения вируса. Генерализация инфекционного процесса была у всех подопытных животных.

Чувствительность естественно-восприимчивых животных к вирусу ящура типа О №1734/Приморский/2000. У всех животных после интрадермолингвального заражения ВЯ типа О №1734/Приморский/2000 наблюдали образование превичных афт через 24-30 часов и генерализацию инфекционного процесса на 3-4 сутки. Кроме того, у животных при проведении второго и третьего пассажей наблюдали воспаление основания рога, сопровождающееся сильной болезненностью при пальпации. Титр инфекционной активности ВЯ типа О №1734/Приморский/2000 на 4 пассаже, определенный по методу Гендерсона, составил $4,85 \lg$ ИД₅₀/0,1мл, а при титровании в КК СП – $7,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл.

Антигенное соответствие эпизоотических изолятов вируса ящура типа О производственным штаммам в РМН. Было установлено, что эпизоотические изоляты и штаммы ВЯ типа О №1759/Монголия/2001 ($r_1 = 0,6$), О₁ Маниса ($r_1 = 0,85$), О₁ №1618 ($r_1 = 0,75$) и О₁ №194 ($r_1 = 0,44$) антигенно родственны производственному штамму О №1734/Приморский/2000. В то же время изоляты О Тайвань 3/97, О Индия 53/79 и О №1685/Московский/95 имеют антигенные отличия от производственного штамма ВЯ О №1734/Приморский/2000 (показатель $r_1 < 0,3$) (табл. 3).

Таблица 3

Результаты определения антигенного соответствия (r_1) эпизоотических изолятов и штаммов вируса ящура типа О производственному штамму типа О № 1734/Приморский/2000 в реакции микронеутрализации

Изоляты и штаммы вируса ящура	r_1
О Тайвань 3/97	0,05
О №1759/Монголия/2001	0,6
О Индия 53/79	0,18
О ₁ Маниса	0,85
О №1685/Московский/95	0,21
О ₁ №194	0,44
О ₁ № 1618	0,75

Кроме того, было проведено изучение антигенного соответствия эпизоотических изолятов вируса ящура типа О, выделенных в 2007 году, производственным штаммам вируса ящура типа О № 1734/Приморский/2000 и О₁ №1618. Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Результаты определения антигенного соответствия (r_1) эпизоотических изолятов вируса ящура типа О, выделенных в 2007 г. производственному штамму типа О № 1734/Приморский/2000 в реакции микронеитрализации

Эпизоотические изоляты вируса ящура	r_1
О Казахстан/2007	1,0
О Киргизия 1/2007	0,68
О Киргизия 2/2007	0,34
О Нагорный Карабах/2007	0,5

Таблица 5

Результаты определения антигенного соответствия (r_1) эпизоотических изолятов вируса ящура типа О, выделенных в 2007 г., производственному штамму типа О₁ №1618 в реакции микронеитрализации

Эпизоотические изоляты вируса ящура	r_1
О Казахстан/2007	0,5
О Киргизия 1/2007	0,49
О Киргизия 2/2007	0,43
О Нагорный Карабах/2007	0,36

При этом было установлено, что все выделенные в 2007 году эпизоотические изоляты являются антигенно родственными производственным штаммам ВЯ типа О № 1734/Приморский/2000 и О₁ №1618, поскольку показатель r_1 больше 0,3.

Изучение биологических свойств вируса ящура типа Азия-1

Репродуктивные свойства эпизоотических изолятов вируса ящура типа

Азия-1. При изучении репродуктивных свойств изолятов ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, Азия-1 №1991/Монгольский/2005, Азия-1 №1994/Приморский/2005 и Азия-1 №2002/Читинский/2006 в КК ПСГК-30, КСТ, КГ-91, СПЭВ, ПК, ИВ-RS-2, ВНК-21 заметные морфологические изменения наблюдались уже в первых пассажах. К 3-4 пассажу титры изучаемых изолятов ВЯ типа Азия-1 составляли от 4,0 до 7,5 lg ТЦД₅₀/мл при

времени репродукции 18-24 ч. При репродукции изолятов ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 и Азия-1№1994/Приморский/2005 в КК RSK не отмечали полного разрушения монослоя, однако накопление вируса было не ниже, чем в остальных используемых клеточных культурах.

Бляшкообразующие свойства вируса ящура типа Азия-1 №1994/Приморский/2005. Изолят ВЯ типа Азия-1 №1994/Приморский/2005, репродуцированный в различных КК, образовывал негативные колонии как в КК КСТ, так и в IB-RS-2. Так, изучаемый эпизоотический изолят ВЯ, репродуцированный в КК КГ-91, имел титр инфекционной активности в СП выше ($6,25 \pm 0,25 \lg$ ТЦД₅₀/мл), чем тот же показатель, определенный по БОЕ ($5,3 \pm 0,16 \lg$ БОЕ/мл). В то же время титры инфекционной активности изолята после репродукции в КК КСТ, определенные по ТЦД и по БОЕ, значительно не различались.

Чувствительность невакцинированных и иммунных естественно-восприимчивых животных к штамму вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005. У овец и свиней, взятых в опыт, до начала эксперимента отсутствовали антитела к структурным и неструктурным полипептидам вируса ящура. После заражения овец ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, на вторые сутки наблюдения отмечали гипертермию и эрозии на слизистой оболочке языка. К 6-7 сут после заражения у двух животных были обнаружены афтозные поражения в области пяточных углов и межкопытцевой щели. Антитела к ВЯ типа Азия-1 в разведении 1:128 и неструктурному полипептиду ВЯ 3А – 1:1280 выявляли у зараженных овец с 10-х сут после заражения. У овцы, находящейся в контакте с зараженными, антитела к ВЯ в разведении 1:32 обнаруживали только на 21 сут после заражения. Через 30 сут у всех овец вируснейтрализующие антитела выявляли в разведениях сывороток 1:128 – 1:256, а антитела к неструктурному полипептиду ВЯ 3А – в разведениях 1:320 – 1:2560. В течение всего периода наблюдения у незараженной неиммунной овцы

признаков заболевания не наблюдали. Однако результаты исследований сывороток крови на наличие противоящурных антител, в том числе антител к неструктурному полипептиду ВЯ 3А указывают на переболевание животного ящуром в бессимптомной форме.

У поросят, после заражения ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, через 40-42 ч наблюдали повышение температуры до 41°C. На 4 сутки наблюдения, появились обширные вторичные афтозные поражения. На 4-6 сутки наблюдения подобная клиническая картина ящура развилась и у поросенка, находящегося в контакте с зараженными. На момент появления клинических признаков заболевания у поросят в сыворотке крови антитела к ВЯ типа Азия-1 и к неструктурным белкам ВЯ 3А не обнаружили. Однако, на 12 день после заражения, наличие антител к 3А полипептиду было установлено в разведениях 1:160–1:320, а противоящурных антител к типу Азия-1 – 1:128–1:256, что свидетельствует о переболевании свиней ящуром.

К началу опыта, у коз выявляли поствакцинальные антитела к ВЯ типа Азия-1 в разведениях сывороток 1:64 – 1:128. В то же время ни у одного из вакцинированных животных до начала эксперимента не были обнаружены антитела к неструктурному полипептиду ВЯ 3А. В сыворотках крови, отобранных на 12-й день после начала эксперимента, антитела к неструктурным полипептидам обнаруживали в разведениях 1:320 – 1:1280 у зараженных коз.

Антигенное соответствие эпизоотических изолятов вируса ящура типа Азия-1 производственному штамму Азия-1 Шамир 3/89 в РМН. В ходе работы было установлено, что изоляты вируса ящура типа Азия-1, вызвавшие вспышки в России и Монголии в 2005-2006 гг., по результатам РМН антигенно отличаются от производственного штамма типа Азия-1 Шамир 3/89, поскольку их антигенное соответствие (показатель τ_1) составляет <0,3 (табл.6).

Таблица 6.

Результаты определения антигенного соответствия (r_1) эпизоотических изолятов вируса ящура типа Азия-1, выделенных во время вспышек 2005-2006 годов, производственному штамму Азия-1 Шамир 3/89 в реакции микронеутрализации

Эпизоотические изоляты вируса ящура	r_1
Азия-1 №2002/Читинский/06	0,090
Азия-1 №2003/Читинский/06	0,125
Азия-1 №1987/Амурский/05	0,125
Азия-1 №1994/Приморский/05	0,125
Азия-1 №1991/Монголия/05	0,180

Двустороннее антигенное родство вируса ящура типа Азия-1 в РСК. Изолят вируса ящура типа Азия-1 №1991/Монголия/2005 является антигенно родственным штамму вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 ($R = 83\%$), который 16 мая 2006 года был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ «ВГНКИ»). В то же время он антигенно отличается от производственного штамма типа Азия-1 Шамир 3/89 и Азия-1 №48 ($R\%$ составляет 28 и 35 % соответственно) (табл. 7).

Таблица 7

Результаты определения двустороннего антигенного родства изолята вируса ящура Азия-1 №1991/Монголия/2005 в реакции связывания комплемента

Штаммы вируса ящура	r_1	r_2	$R\%$
Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,77	0,90	83
Азия-1 №48	0,22	0,36	28
Азия-1 Шамир 3/89	0,35	0,22	35

Банк сывороток крови. По результатам проведенных исследований был создан банк референтных сывороток крови, полученных от КРС и свиней, иммунизированных противоящурными моновалентными вакцинами против ВЯ типов А, О и Азия-1, а также пополнен банк гипериммунных сывороток морских свинок. Сыворотки вакцинированных животных используются в РМН для определения антигенного соответствия

эпизоотических изолятов вакцинным штаммам ВЯ. Гипериммунные сыворотки морских свинок использовались для диагностических целей при типировании новых изолятов вируса ящура и для определения двухстороннего антигенного родства в РСК.

4. ВЫВОДЫ

1. По результатам определения антигенного соответствия установлено, что изоляты вируса ящура типа Азия-1, выделенные во время вспышек на территории России и Монголии в 2005-2006 гг., антигенно отличаются от производственного штамма Азия-1 Шамир 3/98 ($r_1 = 0,09-0,18$). При определении двустороннего антигенного родства изолята ВЯ Азия-1 №1991/Монголия/2005 и производственных штаммов Азия-1 установлено, что он родственен штамму Азия-1 №1987/Амурский/2005 ($R\% = 83\%$) и антигенно отличается от штаммов ВЯ типа Азия-1 №48 и Азия-1 Шамир 3/98 ($R\% = 28\%$ и 35% соответственно).

2. Определено, что изоляты вируса ящура типа А, выделенные на территории Турции и Ирана в 2005-2006 гг. по результатам изучения двустороннего антигенного родства являются близкородственными ($R\%=70\%$), но отличаются от производственных штаммов вируса ящура типа А₂₂ №550 Азербайджан ($R\%=13$) и А №1707/Армения/98 ($R\%=10\%$). По результатам определения одностороннего антигенного соответствия изоляты линии А Иран/05 антигенно родственны производственному штамму А₂₂ Ирак 24/64 ($r_1 = 0,49-0,78$), за исключением изолята А Турция 969/06 ($r_1 = 0,26$).

3. Показано, что изоляты вируса ящура типа О: О Казахстан 2007, О Киргизия 1/2007, О Киргизия 2/2007 и О Нагорный Карабах/2007 являются антигенно родственными производственным штаммам вируса ящура типа О₁ №1618 и О №1734/Приморский/2000 ($r_1 = 0,34 - 1,0$).

4. Изучены особенности бляшкообразования и репродукции в клеточных культурах эпизоотических изолятов, выделенных в последние годы, и лабораторных штаммов вируса ящура типов А, О, и Азия-1.

5. Установлено, что изолят вируса ящура типа Азия-1/1987/Амурский, вызывает заболевание ящуром неиммунных свиней и овец без предварительной адаптации вируса.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты проведенных исследований использованы при подготовке штамма вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, который после изучения и паспортизации депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ «ВГНКИ») (2006г.).

Создан банк сывороток крови свиней и КРС иммунизированных моновалентными противоящурными вакцинами. Входящие в банк сыворотки используются при определении антигенного соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам вируса ящура в РМН.

По материалам работы подготовлены, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГУ «ВНИИЗЖ») «Методические указания по определению антигенного соответствия между производственными штаммами вируса ящура и эпизоотическими изолятами в реакции микронеutralизации» (2007г.).

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Жильцова М.В. Сравнительное изучение чувствительности новых культур клеток к вирусу ящура/М.В. Жильцова, С.Р. Кременчугская, Т.А. Фомина, Н.В. Коропова//Актуальн.пробл.инф.патол. ж-ных: матер. Междунар. научн. конф., посвящен.45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ».- Владимир, 2003.-С.247-249 Жильцова М.В.
2. Изучение способности к репродукции в клеточных культурах вариантов вируса ящура типа А, отличающихся по биологическим свойствам/Жильцова М.В., Кременчугская С.Р., Фомина Т.А. и др.// пробл. мониторинг. и генодиагност. инф. бол. ж-ных: Матер. Междунар. Науч. конф. Молодых ученых, 24-26 марта 2004 г.-Владимир, 2004.- С.85-88.

3. Современные методы контроля иммуногенности противоящурных вакцин и оценки иммунитета/Н.Е Камалова, С.Р. Кременчугская, В.М. Захаров, **М.В. Жильцова** и др./Сб. научн. Трудов ВГНКИ.-М., 2005.-Т.66.-С39-45
4. **Жильцова М.В.** Изучение репродуктивных свойств изолятов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в России во время вспышек в 2005-2006 гг./М.В. Жильцова//Вет. патол. -2006.-№4.-С.31-34
5. **Жильцова М.В.** Изучение восприимчивости культур клеток и восприимчивых животных к изоляту вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005/ М.В. Жильцова, С.Р. Кременчугская, А.В. Каньшина и др//Тр. Федерального центра охраны здоровья животных.-Владимир, 2006.-Т.4.-С.71-80
6. Результаты изучения изолята вируса ящура типа Азия-1 №1991/Монголия/2005/ **М.В. Жильцова**, С.Р. Кременчугская, А.И. Егорова, Т.Ф. Кошецял// Тр. Федерального центра охраны здоровья животных.-Владимир, 2007.Т.5.-С.59-66
7. **Жильцова М.В.** Изучение биологических свойств вируса ящура линии А Иран/05./М.В. Жильцова, С.Р. Кременчугская, А.И. Егорова, В.В. Борисов//Российский ветеринарный журнал, вып. посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ»; сентябрь 2008 с. 15-16
8. Кременчугская С.Р. Антигенное соответствие изолятов вируса ящура линии А Иран/05 производственным штаммам типа А₂₂ /С.Р. Кременчугская, **М.В. Жильцова**, В.В. Михалишин, и др. // Российский ветеринарный журнал, вып. посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» сентябрь 2008 с. 16-18
9. Кременчугская С.Р. Изучение изолятов вируса ящура типов А, О, Азия-1 выделенных в 2002...2003 гг. в республике Таджикистан/ С.Р. Кременчугская, А.В. Щербаков, А.М. Тимина, А.И. Егорова, **М.В. Жильцова**, и др. // Российский ветеринарный журнал, вып. посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» сентябрь 2008 с. 18-21