

На правах рукописи



ФОМИНА Светлана Николаевна

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ЯНЦУРА
ТИПА АЗИЯ-1, ШТАММ №1987/АМУРСКИЙ/2005,
И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

7

16 00 03 «Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунологией»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Владimir – 2007

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

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор
Михалишин Валерий Васильевич

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Минченко Владимир Александрович
ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», г. Владимир,

доктор ветеринарных наук, старший
научный сотрудник,
Коломыцев Алексей Александрович
ГПУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт ветеринарной
вирусологии и микробиологии»
(ВНИИВВиМ), г. Покров Владимирской
области

Ведущая организация ГПУ «Всероссийский научно-
исследовательский и технологический
институт биологической промышленности»
(ВНИТИБП), г. Щелково Московской
области

Защита диссертации состоится «15» мая 2007 г. в 10 часов на
заседании диссертационного совета 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 «13» апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

 Г. М. Семенова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ящур является одной из экономически важных болезней животных во всем мире, так как им болеют сельскохозяйственные и дикие животные многих видов (Бойко А А ,1971, Ререр Х , 1971, Бурдов А Н с соавт , 1990, Захаров В М , 2002, Leforban, 2003, Груздев К Н с соавт , 2005) Наряду с непосредственными убытками, причиненными вирусом ящура популяциям животных, ущерб слагается из введения торговых ограничений, которые относятся как к животным, так и к продуктам животного происхождения

Одним из основных методов профилактики ящура является систематическая иммунизация сельскохозяйственных животных инактивированными моно- и поливалентными вакцинами Непременным условием противоэпизоотической эффективности противоящурных вакцин является соответствие антигенных свойств производственного (вакцинного) штамма вируса ящура эпизоотическим штаммам вируса, которое определяется на основании систематического и всестороннего сравнительного изучения антигенных свойств штаммов вируса ящура В результате этой работы решается вопрос о необходимости подготовки нового производственного штамма вируса, или о применении вакцины из ранее используемого для изготавления производственного штамма В случае антигенного отличия эпизоотических штаммов от производственного штамма и наличия угрозы широкого распространения ящура из числа выделенных эпизоотических штаммов производится подготовка нового производственного штамма вируса ящура

Эпизоотии, вызванные вирусом ящура типа Азия-1, наблюдаются в странах Азии, Среднего и Ближнего Востока Вирус этого типа и в настоящее время представляет угрозу для этих регионов, так как вспышки ящура периодически возникают в различных государствах, в том числе и граничащих с нашей страной

Согласно новой редакции «Санитарного кодекса наземных животных МЭБ, 2006 г » диагноз на ящур устанавливается в случае

- выделения вируса от животных или продуктов животного происхождения,
- выявления антигена вируса ящура или РНК вируса от животных с клиническими признаками ящура или при подозрении на яшур,
- выявления антител к структурным или неструктурным белкам вируса ящура, не связанных с вакцинацией, в случае клинического проявления ящура или при подозрении на яшур

Поэтому особое значение приобретает проблема диагностики и профилактики этой болезни. Опасность, которую представляет ящур, диктует необходимость постоянного усовершенствования методов и средств его диагностики, изучения свойств вновь выделенных эпизоотических штаммов возбудителя, определения их эпизоотической опасности и степени соответствия производственным и ранее выделенным штаммам.

Долгие годы методами идентификации вируса ящура были реакции связывания комплемента (РСК) и вируснейтрализация (РН). В качестве биологического метода использовали выделение вируса в лабораторных тест-системах. Совершенно уникальными возможностями обладают некоторые новые методы, такие как, иммуноферментный анализ (ИФА). Для него характерна высокая чувствительность, простота постановки и быстрота получения результата. По специфичности результаты ИФА согласуются с общепринятыми вирусологическими и серологическими методами, а по чувствительности имеют явные преимущества. ИФА позволяет получить больше информации об антигенической структуре вирусов в отличие от традиционных серологических реакций.

В связи с тем, что на Дальнем Востоке России в 2005 г был зарегистрирован ящур типа Азия-1, который экзотичен для России и занесен из Китая, возникла необходимость изучении штамма вируса ящура типа Азия-1, который был выделен в 2005 г от заболевших животных. Указанные

вопросы являются актуальными, что и послужило главной целью проведения наших исследований

Цель и задачи исследований. Главной целью наших исследований было изучение иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 и усовершенствование диагностического набора для выявления и идентификации вируса ящура методом иммуноферментного анализа

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи

- изучить иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 г ,

- подготовить предложения по использованию штамма вируса ящура №1987/Амурский/2005 для изготовления диагностических и вакцинных препаратов,

- получить диагностические препараты на актуальные эпизоотические штаммы вируса ящура для иммуноферментного анализа,

- усовершенствовать набор для идентификации в ИФА производственных и эпизоотических штаммов вируса ящура типов А, О, Азия-1,

Научная новизна.

Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований

Изучены иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 году, который значительно отличается от вакцинных и ранее изученных эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1;

Изучены основные биологические свойства антигена вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, используемого для изготовления инактивированной вакцины,

Показаны антигенные взаимоотношения между производственными и эпизоотическими штаммами вируса ящура типа Азия-1,

Получены штаммоспецифические компоненты для иммуноферментного анализа и реакции связывания комплемента на штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005

Усовершенствован диагностический набор для определения антигена вируса ящура иммуноферментным анализом;

Определены оптимальные варианты постановки ИФА при выявлении и идентификации штаммов вируса ящура,

Изучена диагностическая ценность ИФА в сравнении с другими серологическими реакциями, используемыми в лабораторной диагностике вируса ящура

Практическая ценность работы. Изученный штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» и рекомендован для изготовления диагностических препаратов и противоящурной вакцины против этого типа вируса ящура

Получены диагностические препараты с использованием изученного штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005

Усовершенствован и внедрен в производство набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом, ТУ 9388-138-00495527-2005 от 30 06 2006 г.

Апробация результатов работы. Результаты исследований по теме диссертации апробированы на научных конференциях «Золотое кольцо России» - 4-й региональной конференции, посвященной проблеме профилактики и лечения домашних животных и птицы. – Владимир, 2001, международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» г Владимир, 2003г., 2-й международной научно-практической конференции

«Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики, как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных», г Ставрополь, 2003г, 6-ом международном конгрессе ветеринарной вирусологии «Эволюция и персистенция вируса», прошедшем в г Сант-Мalo во Франции в 2003 году, международной научной конференции молодых ученых «Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных», г Владимир, 2004

«Набор для выявления антигена вируса ящура в пробах материала иммуноферментным анализом» был представлен на выставке продукции ФГУ «ВНИИЭЖ», при проведении Всероссийского научно-практического семинара-совещания ветеринарных специалистов «Эпизоотологический мониторинг, профилактика и меры борьбы с болезнями КРС и свиней», 2005г, г Владимир

Основные положения диссертации были доложены на заседаниях ученого совета ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Основные положения, выносимые на защиту:

- Адаптационные свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Результаты комплексного изучения антигенного родства штамма вируса ящура Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Получение штаммоспецифических диагностических препаратов на основе штамма Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Результаты практического применения эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Диагностический набор для определения антигена вируса ящура методом иммуноферментного анализа и его практическое применение

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, список

используемой литературы, практические предложения и приложения Список литературы включает 157 источников, из них 63 источников иностранных авторов Работа иллюстрирована 20 таблицами, 3 рисунками В приложении к диссертации имеется 4 документа, подтверждающих результаты исследований и их внедрение

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «Ящура и везикулярных болезней», лаборатории «Биотехнологии», лаборатории «Диагностики особо опасных болезней животных», Отделу биологического и технологического контроля, научной библиотеке ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» за практическую помощь при выполнении и оформлении диссертации

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Штаммы вируса ящура. В исследованиях использовались штаммы вируса ящура А₂₂ №550, О₁ №194, Азия-1 №48, Азия-1 №1737/Грузия/2000, Азия-1 №1730/Иран58/99, Азия-1 №1731/Таиланд2/95, Азия-1 /Ирак1/73, Азия-1 №1960/Таджикистан/2004, Азия-1/Шамир 3/89, Азия-1/Пакистан1/54

Впервые выделенный в Российской Федерации штамм вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005

Вакцины. Вакцины, используемые в данной работе, включали инактивированные сорбированные коммерческие и экспериментальные серии, изготовленные ФГУП «Щелковский биокомбинат» и ФГУ «ВНИИЗЖ», а также инактивированные эмульсионные вакцины производства фирмы «Bayer AG» (Германия)

Животные. В опытах использовался крупный рогатый скот 8 – 10 месячного возраста, черно-пестрой породы, массой 250 – 295 кг Все животные были получены из благополучных по инфекционным болезням хозяйств Владимирской области

Для получения штаммоспецифических сывороток, проверки иммуногенности производственной и экспериментальной вакцин, адаптации и титрования вируса ящура использовали клинически здоровых морских свинок массой 400-450 г и кроликов, массой не менее 2,5-3,0 кг.

Культуры клеток. В качестве чувствительной тест-системы для титрования вирусов, их репродукции и постановки реакции нейтрализации использовались монослойные культуры перевиваемых клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почки свиньи (IB-RS-2), а также культура первично - трипсинизированных клеток почки поросят (СП)

Оборудование. В опытах использовались спектрофотометр - ридер «Униплан» (Россия), СО₂ -инкубатор «Sanyo» (Япония), ламинарный шкаф «Babcock-BSH» (ГДР), инвертированный микроскоп «Olympus» (Япония)

Адаптация эпизоотических изолятов вируса ящура к культуре клеток и лабораторным животным. Адаптацию вируса к культуре клеток и лабораторным животным проводили общепринятым методом.

Вирус считали адаптированным к организму морских свинок, если первичные афты образовывались через 20-26 часов, а генерализация процесса наступала через 48 часов, инфекционная активность не менее 4,5 Ig ИД₅₀.

Первичную и перевиваемые культуры клеток инокулировали 10% супензией в дозе 0,1 мл В последующих пассажах для заражения использовали культуральные супензии Вирус считали адаптированным к культуре клеток, если он вызывал выраженное ЦПД, через 18-24 часа после инфицирования

Выделение вируса ящура. Выделение вируса ящура с использованием чувствительных культур клеток осуществляли согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура» утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10 11 2002

Реакция связывания комплемента. При выполнении данной работы идентификацию штаммов вируса ящура, определение комплемент-

связывающей активности и специфичности полученных антигенов и сывороток проводили путем постановки РСК в соответствии с ГОСТ 25384 «Методы лабораторной диагностики ящура»

Изучение антигенного родства методом РСК выполняли согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10 11.2002

Реакция нейтрализации. Реакция ставилась на планшетах фирмы «Costar» микрометодом согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10 11 2002г

Имуноферментный анализ. Выделение вируса ящура в патологического материала методом ИФА выполняли согласно «Временному наставлению по применению набора для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом», разработанному в ФГУ «ВНИИЭЖ» и утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 22 04 2002.

Выявление и определение уровня антител к вирусу ящура в сыворотке крови осуществлялось с помощью «Набора для выявления антител к вирусу ящура иммуноферментным анализом» производства ФГУ «ВНИИЭЖ» согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10 11 2002г, коммерческих наборов, полученных из ВСЛ (Пирбрайт, Великобритания)

Определение иммуногенной активности противоящурных вакцин. Иммуногенные свойства противоящурных вакцин определяли на основании ТУ 9384-007-00495527-200 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)» от 02 02 2000г

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура Азия-1 типа №1987/Амурский/2005

До 2005 года яшур, вызванный вирусом ящура типа Азия-1, не регистрировался на территории Российской Федерации. Однако, в 2005 году ситуация значительно осложнилась, в связи с заносом экзотического для страны, вируса ящура типа Азия-1 в Амурскую область, Хабаровский и Приморский края, Читинскую область

Первый очаг ящура типа Азия-1 был зарегистрирован в июне 2005 года в с. Буссе Свободненского района Амурской области. В связи с наличием на территории РФ единственного очага ящура типа Азия-1, с учетом действующего законодательства и рекомендаций МЭБ, 18-19 июня 2005 г все животные в данном неблагополучном пункте были отчуждены и уничтожены

Однако, во второй половине августа 2005 года новые очаги ящура типа Азия-1 были зарегистрированы почти одновременно еще в двух регионах в Хабаровском и Приморском краях в населенных пунктах, расположенных на границе с Китаем. В это же время поступило сообщение о возникновении ящура и в Монголии

В Хабаровском крае яшур был установлен в Бикинском и Вяземском районах. Более широкое распространение яшур типа Азия-1 получил в Приморском крае. Всего в 9 неблагополучных по яшуре пунктах Приморского края заболело более 1000 голов КРС

В декабре 2005 г в Дальневосточном федеральном округе было выявлено два новых неблагополучных по яшуре пункта в двух районах, граничных с Китаем. Единичные случаи заболевания зарегистрировали в с. Куприяново Михайловского района Амурской области и в с. Котиково Вяземского района Хабаровского края. В 2006 г были отмечены вспышки ящура типа Азия-1 в с. Средняя Борзя Калганского района Читинской области и в с. Куропатино

Тамбовского района Амурской области, расположенных вблизи границы Китая

Следует отметить, что исследования, проведенные А В Щербаковым с соавт (2006), показывают, что данные вспышки ящура вызваны вирусом, аналогичным штамму Азия-1 №1987/Амурский/20005

**Биологические свойства вируса ящура штамма Азия-1
№1987/Амурский/20005**

Из вирусодержащих материалов (афты), полученных от больного КРС из эпизоотического очага, готовили 10% суспензию материала, которую использовали для заражения клеточных культур СП, ПСГК-30, ВИК-21, IB-RS-2. Культивирование вируса проводили в плоских стеклянных сосудах (матрасах) емкостью 50 и 1500 см³

Вирус считали адаптированным, если 90-100% ЦПД в монослое культуры клеток наступало через 18-26 часов после заражения. Полученные результаты представлены в таблице 1

Таблица 1

**Биологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура
Азия-1 №1987/Амурский/2005.**

Система репродукции вируса	Кол-во пассажей	Время проявления биологической активности, часы	Характеристика адаптированного материала			
			Активность в РСК	Гипр вируса, Ig 1ЦД50/мл	Содержание, мкг/мл	
					ОВБ	146S +75S
СИ	3	18-24	1 4	6,0±0,25	-	-
ПСГК-30	3	18-20	1 4	6,33±0,25	0,54	0,2
IB-RS-2	3	18-20	1 8	7,66±0,25	1,4	0,47
ВИК-21	3	18-20	1 12	8,25±0,25	0,79	0,4
Морские свинки	6	21-24	-	5,5±0,25	-	-

Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005 проводили на морских свинках путем

введения вирусосодержащей суспензией в плантарную поверхность задних лапок методом туннелирования Вирус считали адаптированным к морским свинкам, если в течение 2-3 последовательных пассажей он вызывал у 95% морских свинок образование первичных афт через 18-26 часов, а генерализацию не позднее 5 суток после заражения (таб. 1)

Результаты показывают, что изолят Азия-1 №1987 /Амурский/2005 адаптирован на третьем пассаже, вызывая 100% ЦПД через 18 часов после инокуляции культуры клеток Комплементсвязывающая активность в РСК составила 1 8 – 1 12 Наибольшее накопление вируса происходит в культуре клеток ВНК-21 и IB-RS-2 в титрах 7,66-8,25 Ig ТЦД₅₀/см³

Кроме того, данный штамм был адаптирован к культурам клеток СП и ПСГК-30 Активность в РСК составила 1 4, вирус накапливается в титрах 6,33-7,66 Ig ТЦД₅₀/см³

У морских свинок полное созревание афт с большим количеством афтозной жидкости на месте введения наблюдали через 21-28 часов после введения вируса на уровне 5-6 пассажа

Изучение антигенного родства штамма вируса ящура Азия-1

№1987/Амурский/2005

Антигенное родство исследуемого эпизоотического штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 с другими штаммами вируса ящура данного типа изучали в РСК по 100% гемолизу с вычислением «R» по формуле Архетти и Хорсвала Данные исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории ящура и везикулярных болезней ФГУ «ВНИИЗЖ» к в н. В К Спириным, к в н А И Егоровой, ветеринарным врачом Т Ф Кощецян

Результаты изучения двустороннего антигенного родства вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 с производственными и эпизоотическими штаммами этого типа, выделенными ранее, представлены в таблице 2

Таблица 2

**Антителенный спектр штамма вируса ящура серологического типа
Азия-1 №1987/Амурский/2005 по данным РСК**

Сравниваемые штаммы	Показатели антителенного родства штаммов		
	Г ₁	Г ₂	R%
Азия-1 №48	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,16	0,42
Азия-1 №1737/Грузия/2000	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,08	0,22
Азия-1 №1730/Иран 58/99	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,07	0,64
Азия-1 №1731/Таиланд 2/95	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,22	0,80
Азия-1 №1960/Таджикистан/2004	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,28	0,56
Азия-1/Шамир 3/89	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,20	0,15
Азия-1 /Пакистан 1/54	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,23	0,14
Азия-1 /Иран 1/73	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,18	0,60
			33

Анализируя данные таблицы 2, следует отметить, что согласно критериям Бруксби (1968) эпизоотический штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 отличается от всех исследованных штаммов вируса ящура типа Азия-1 и значительно отличается от вакциновых штаммов Азия-1 №48 и Азия-1 Шамир 3/89 (R% составило 26% и 17% соответственно) Кроме того, он отличается от ранее выделенных эпизоотических изолятов вируса ящура типа Азия-1.

В связи с тем, что, по данным Всемирной справочной лаборатории, вакцина из штамма Азия-1 /Шамир 3/89 имеет широкий антителенный спектр, нами было проведено определение антителенного родства эпизоотического штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 и этого вакцинового штамма в РН В нашей работе использовались сыворотки крови молодняка КРС, отобранной на 21 сутки после иммунизации двумя сериями моновалентной эмульсионной инактивированной вакцины против ящура типа Азия-1 /Шамир 3/89 и одной серией инактивированной эмульсионной вакциной против ящура типов «A₂₂, O, Азия-1» фирмы «Bayer AG»

Вначале сыворотки крови вакцинированных животных исследовались индивидуально в РН и ИФА для определения титра вируснейтрализующих противоящурных антител. Данные представлены в таблице 3

Таблица 3

Степень антигенного родства (r_1) вируса Азия-1 1987 по отношению к штамму Азия-1 Shamir 3/89

№№ животных	Наименование вакцины						
	Вакцина из штамма Азия-1 /Шамир 3/89				трехвалентная из штаммов A ₂₂ , O, Азия-1		
	моновалентная №1		моновалентная №2		РН	ИФА	
РН	ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА		
1	0,25	0,26	0,17	0,24	0,35	0,23	
2	0,20	0,24	0,28	0,25	0,4	0,25	
3	0,25	0,25	0,20	0,20	0,3	0,25	
4	0,30	0,2	0,15	0,19	0,36	0,24	
5	0,22	0,25	0,22	0,25	0,32	0,21	

Некоторые исследователи (Rweymamu M M , 1984, Шажко Ж А , 1986, Минченко В А, 1988, Paton D J, 2005) считают, что использование индивидуальных проб сывороток крови при определении антигенного родства может стать причиной диагностических ошибок. Поэтому необходимо использовать пул сывороток

Исходя из этого, каждую группу сывороток (таблица 3) объединяли в пул для нивелирования индивидуальных различий. В пулы входили сыворотки, имеющие приблизительно одинаковые титры антител. Каждую смесь сывороток исследовали в РН с вирусом ящура следующих штаммов вируса ящура Азия-1/Шамир 3/89, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1987/Амурский/2005

Параллельно с РН сыворотки были исследованы в жидкофазном блокирующем варианте ИФА. В реакции использовались инактивированные

концентрированные антигены штаммов вируса ящура Азия-1 /Шамир 3/89, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1987/Амурский/2005

Результаты данных исследований представлены в таблице 4

Таблица 4

Степень антигенного родства (r_1) штаммов вируса ящура Азия-1

№ пул иммунных сывороток к вирусу ящура штамм Азия-1 /Шамир 3/89	Азия-1 №1987/Амурский/2005		Азия-1 Иран 58/99	
	РН	ИФА	РН	ИФА
1 пул	0,25	0,25	0,7	0,5
2 пул	0,18	0,25	0,5	0,5
3 пул	0,35	0,25	0,7	0,5

В результате проведенных опытов установлено значение антигенного родства – r_1 , равное 0,25 в ИФА для штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005, что по критериям D J Paton (2005) свидетельствует о значительном отличии эпизоотического изолята от вакцинного штамма, следовательно вакцина, изготовленная из штамма Азия-1 Шамир 3/89, не будет защищать от полевого изолята Азия-1 №1987/Амурский/2005

Полученные данные исследования совпадают с результатами опытов осуществленными в лаборатории диагностики особо опасных болезней животных ФГУ «ВНИИЗЖ», А В Щербаков с соавт (2006) Результаты филогенетического анализа показали, что изоляты вируса ящура, выделенные в Амурской области, Хабаровском и Приморском краях, значительно отличаются от вакцинного штамма, а также от эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных до 2005г

**Изучение иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1
№1987/Амурскни/2005 на морских свинках**

При сравнительной оценке иммуногенной активности использовалась экспериментальная моновалентная инактивированная сорбированная вакцина из штамма Азия-1 №1987/Амурскни/2005. Иммуногенную активность данной вакцины сравнивали с моновалентной сорбированной вакциной из штамма Азия-1 Иран 58/99.

При определении иммуногенной активности каждого препарата использовали по 128 морских свинок и 4 группы морских свинок, по 6 животных в каждой, для контроля. Вакцины инокулировали в цельном виде и в разведении 1:3, 1:9 и 1:27, разведения делали на фосфатном буферном растворе. Каждое разведение вакцины вводили 8 морским свинкам, которых содержали в отдельных вольерах.

Вакцину вводили внутримышечно в объеме 2 см³ в область правого и левого бедра по 1 см³ одновременно.

Каждую вакцину исследовали на иммуногенную активность против вирусов ящура Азия-1 №48; Азия-1 /Иран 58/99, Азия-1 «Шамир» и Азия-1 №1987/Амурский/2005, адаптированных к организму морских свинок. Всем вакцинированным животным через 21 сутки после иммунизации и контрольным животным вводили вирус интрагермально в плацентарную поверхность правой задней лапки в дозе 10⁴ ГД₅₀/0,1 см³. Учет результатов заражения проводили через 3, 5 и 7 суток и оценивали по генерализации ящурного процесса на передних и левой задней лапках. Генерализацией считали образование вторичных афт хотя бы на одной лапке, в которую не вводили вирус. Контроль вакцины считали действительным, если контрольные животные заболевали генерализованной формой ящура.

Результаты изучения иммуногенной активности моновалентных инактивированных противоящурных вакцин из штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 и штамма Азия-1 Иран 58/99, при контрольном

заражении гомологичными и гетерологичными вирусами морских свинок (МС) представлены в таблице 5

Таблица 5

Перекрестное испытание на морских свинках иммуногенной активности вакцины из вируса ящура Азия-1 Иран 58/99 и вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005

Штаммы ВЯ Азия-1 для контрольного заражения	Вакцина из штамма вируса ящура Азия-1 Иран 58/99				Вакцина из штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005			
	ИмД ₅₀	г ₁ по ИмД ₅₀	ПД ₅₀	г ₁ по ПД ₅₀	ИмД ₅₀	г ₁ по ИмД ₅₀	ПД ₅₀	г ₁ по ПД ₅₀
№48	0,072	0,75	27,78	0,75	0,23	0,2	8,69	0,2
Иран 58/99	0,054	1	37,04	1	0,23	0,2	8,69	0,2
/Шамир 3/89	0,063	0,86	31,75	0,86	0,065	0,69	30,76	0,69
№1987 /Амурский/2005	0,098	0,55	20,41	0,55	0,045	1	42,5	1

Примечание ИмД₅₀ – 50% иммунизирующая доза в прививном объеме для МС, ПД₅₀ – 50% протективная доза в прививном объеме для МС

Из приведенных в таблице 5 данных видно, что в прививном объеме вакцины из штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержалось 42,5 ПД₅₀МС к гомологичному штамму, а к гетерологичным – Азия-1 №48 – 8,69 ПД₅₀МС, Азия-1 /Иран 58/99 – 8,69 ПД₅₀МС, Азия-1 «Шамир» – 30,76 ПД₅₀МС

В то же время количество ПД₅₀МС в прививной дозе вакцины из штамма Азия-1 Иран 58/99 по отношению к гомологичному возбудителю составляет 37,04 ПД₅₀МС, а к гетерологичным Азия-1 №48 – 27,78 ПД₅₀МС, Азия-1 «Шамир» – 31,75 ПД₅₀МС и Азия-1 №1987/Амурский/2005 – 20,41 ПД₅₀МС соответственно

Проведенные исследования показывают, что штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 по иммунобиологическим свойствам отличается от штаммов Азия-1 №48, Азия-1 /Иран 58/99, Азия-1 «Шамир» (г₁ = 0,2, 0,2, 0,69 соответственно)

Вакцина из штамма Азия-1 Иран 58/99 иммуногенна в отношении гетерологичных штаммов Азия-1 №48, Азия-1 «Шамир» и менее иммуногенна в отношении штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005.

Результаты изучения иммунологических свойств инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов О₁ – А₂₂ – Азия-1

В связи с возникновением вспышек ящура типа Азия-1, вызванных отличающимся возбудителем (степень антигенного родства по данным РСК 26%), была изучена иммуногенность и протективная активность коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов А₂₂ - О₁ – Азия-1 на крупном рогатом скоте

С этой целью были сформированы две партии животных по 17 голов в каждой. Каждая партия животных содержалась в отдельном боксе. Животных в каждой партии разделили на 4 группы, три группы по 5 животных и одна группа по 2 головы – контрольная группа

Группы по 5 голов были иммунизированы в дозах 2,0 см³, 0,5 см³, 0,125 см³, контрольные животные не иммунизировались

На 21 сутки после иммунизации одну партию животных заразили производственным штаммом вируса ящура, гомологичным возбудителю, используемому в вакцине. Вторая партия животных была заражена эпизоотическим вирусом (Азия-1 № 1987/Амурский/2005).

На восьмые сутки после контрольного заражения провели отбор проб крови от всех животных и убой животных с их последующим патологоанатомическим исследованием

Результаты опытов по определению иммунологической активности коммерческой серии сорбированной противоящурной вакцины против гомологичного и гетерологичного штаммов вируса ящура Азия-1 приведены в таблице 6

Таблица 6

Иммунологическая активность коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов $O_1 - A_{22} - \text{Азия-1}$ против гомологичного и гетерологичного штаммов вируса ящура Азия-1

Вирус ящура типа Азия-1 для контрольного заражения	Титры антител (\log_2) в сыворотках крови КРС, привитых вакциной в дозе 2.0 см^3 к вирусу				Результаты контрольного заражения			ПД ₅₀	
	Производствен-ный №48		Азия-1 № 1987 /Амурский/2005		Прививная доза вакцины (см^3)				
	РН	ИФА	РН	ИФА	2.0	0.5	0.125		
Производствен-ный №48	7,6	7,0	5.3	5,0	4/5	4/5	3/5	10.56	
Эпизоотический Азия-1 № 1987/ Амурский/2005	5,2	5,0	7.4	7,0	3/5	2/5	2/5	3.5	

Примечание числитель – количество животных устоявших против прямого заражения штаммом вируса ящура Азия-1 №1987/ Амурский/2005, знаменатель – всего животных в группе

Представленные в таблице 6 данные свидетельствуют о том, что в прививной дозе вакцины содержалось 10,56 ПД₅₀ к производственному штамму вируса ящура и только 3,5 ПД₅₀ к эпизоотическому штамму вируса

На основании полученных данных нами была определена степень одностороннего антигенного родства по протективному действию инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов $A_{22} - O_1 - \text{Азия-1}$ Результаты исследования степени антигенного родства представлены в таблице 7

Таблица 7

Степень одностороннего антигенного родства производственного и эпизоотического штаммов вируса ящура типа Азия-1

Вирус ящура для контрольного заражения	Г ₁				по ПД ₅₀	
	производственный		Азия-1 № 1987/Амурский/2005			
	РН	ИФА	РН	ИФА		
производственный	1	1	0,23	0,25	0,33	
Азия-1 № 1987/Амурский/2005	0,19	0,25	1	1		

Полученные данные, обобщенные в таблице 7 показывают, что штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 значительно отличается от ранее выявленных штаммов вируса ящура типа Азия-1

В завершении работы по изучению иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 были обобщили данные по степени антигенного соответствия (r_1) эпизоотического возбудителя с производственными штаммами вируса ящура типа Азия-1 – таблица 8

Таблица 8

Антигенное соответствие эпизоотического возбудителя вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 и производственных штаммов Азия-1 №48 и Азия-1 Шамир 3/89

Метод определения	Азия-1 №48 / Азия-1 №1987/Амурский/2005	Азия-1 Шамир 3/89 / Азия-1 №1987 /Амурский/2005 /
РСК	0,16	0,20
РН с сыворотками морских свинок	0,18	0,19
РН с сыворотками КРС	0,19	0,18-0,25
ИФА с сыворотками КРС	0,25	0,25
По ИМД ₅₀ МС	0,20	0,69
По ИИД ₅₀ МС	0,20	0,69

Результаты таблицы 8 говорят о том, что исследуемый изолят значительно отличается от производственных штаммов вируса типа Азия-1

Усовершенствование метода выявления антигена вируса ящура в ИФА

Были проведены исследования по разработке чувствительного и специфичного двойного сэндвич варианта ИФА для выявления и прямого типирования вируса ящура в полевых образцах эпителиальной ткани, а также в материале, полученном от экспериментально зараженных животных

Получение специфических реагентов для ИФА

Получение антигена для ИФА. Культуру клеток ВНК-21, выращенную в монослое, заражали вирусом ящура типов А₂₂№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, адаптированным к указанным клеткам в течение 4-5 последовательных пассажей, из расчета 0,1 ТЦД₅₀/клетку и инкубировали при 37-38⁰С После полной дегенерации монослоя, вызванной действием вируса, жидкость из матрасов сливали Полученные вируссодержащие суспензии концентрировали с помощью 8% ПЭГ м м 6000 Приготовленный концентрат очищали от балластных примесей путем супенсирования в нем 10% хлороформа с последующим центрифугированием при 3000 g в течение 20 минут

Концентрат (200 кратный) вируса ящура инактивировали АЭЭИ, который добавляли в вируссодержащую суспензию в концентрации 0,025 % Инактивацию проводили при 26⁰С в течение 16-18 часов Полученный инактивированный антиген проверяли на специфическую активность в ИФА и отсутствие остаточной вирулентности путем инокуляции в монослой культуры клеток СП При отсутствии остаточной вирулентности с активностью в ИФА 1 100 и выше из антигена выделяли 146S компонент путем седиментирования в градиенте хлористого цезия-сахарозы

Получение антителенных препаратов. Иммуноглобулины, необходимые в качестве препаратов антител для создания твердофазного иммunoсорбента и препарата для обнаружения антигена, выделяли из специфических сывороток крови кроликов и морских свинок

Получение улавливающих антител (антитела для сенсибилизации птиц) В качестве доноров использовали кроликов, которых иммунизировали концентрированным, инактивированным 146S компонентом вируса ящура типов А₂₂№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 № 1987/Амурский/2005 содержащими 100-130 мкг/мл вирусспецифического

белка Животных иммунизировали трехкратно Через 14 дней после последней иммунизации животных тотально обескровливали

Специфическую активность улавливающих антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА

Получение детекторных антител. Морских свинок иммунизировали препаратами 146S компонента вируса ящура типов A₂₂№550, O №194, Азия-1 №48, Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержащих 20-40 мкг вирусспецифического белка при двукратной схеме иммунизации

Активность улавливающих антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА

Определение специфичности каждого компонента проводили в сэндвич варианте ИФА с антигенами всех типов, которые используются для комплектования набора (A₂₂№550, O №194, Азия-1 №48, Азия-1 № 1987/Амурский/2005) Используемые препараты антигенов и антител использовали в рабочих титрах В качестве отрицательных контролей использовались гетерологичные антигены вируса ящура и суспензия культуры клеток ВНК-21 Результаты опытов по определению оптимальных концентраций для улавливающих, детекторных антител представлены в таблице 9

Таблица 9

Активность специфических диагностических компонентов в ИФА

Тип антигена	Антитела для сенсибилизации планшет	Детекторные антитела	Антиген
A ₂₂ №550	1·10000	1 5000	1·150
O, №194	1 3000	1 1000	1 100
Азия-1 №48	1 5000	1.3000	1 400
Азия-1 №1987	1 6000	1·2000	1 100

Антитела для сенсибилизации планшет, детекторные антитела и антигены обладали специфической активностью В качестве коньюгата использовались диагностические антитела против Ig G (H+L) морской свинки, коньюгированные пероксидазой (антивидовой коньюгат) производства НИИЭМ им Н.Ф. Гамалеи РАМН (г Москва) Этот препарат оказался эффективным при введении в разрабатываемую тест-систему, стабилен при длительном хранении и удобен для стандартизации

В качестве субстрата применяли пероксидазный субстрат АБТС производства фирмы «Sigma» (США)

Оптимизация условий постановки ИФА

В результате проведенных исследований определен ряд параметров для оптимизации постановки ИФА с целью использования его для контроля вируссодержащего сырья Установлено, что иммобилизацию улавливающих антител необходимо проводить в течение 16-18 часов при 4⁰С в 0,1 карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,5-9,6. Для последующих стадий ИФА использовали фосфатно-буферный раствор pH 7,4-7,6 с добавлением 0,01% Твин-20. Время инкубирования на всех этапах реакции - 1 час при температуре 37⁰С

В качестве блокирующего раствора использовали 10% эмбриональную сыворотку КРС

Сравнительная оценка сэндвич-варианта ИФА и РСК

Для изучения зависимости между результатами определения чувствительности ИФА и РСК были исследованы 14 проб, содержащих антигены вируса ящура антигены, полученные в культуральной системе (ВНК-21 и СП), суспензии афт КРС, лапинизированный вирус В качестве отрицательного контроля использовали биологические системы, в которых культивировался вирус – культуральные суспензии ВНК-21 и СП

В ходе опыта были получены данные, показывающие, что результаты ИФА соответствуют данным, полученным в РСК при исследовании данных проб. Результаты исследований проб антигенов вируса ящура типов A₂₂ №550, O №194, Азия-1 №48 и контрольных образцов культур клеток методом иммуноферментного анализа приведены в таблице 10

Таблица 10

Результаты проверки набора для выявления антигена вируса ящура в пробах материала иммуноферментным анализом

	Наименование антигена	Тип диагностической системы					
		A ₂₂		O ₁		Азия-1	
		РСК	ИФА	РСК	ИФА	РСК	ИФА
1	A ₂₂ №550 10% культ. суспензия	+	+	-	-	-	-
2	A ₂₂ №550 146S компоненты	+	+	-	-	-	-
3	A ₂₂ №550 33% суспензия афт КРС	+	+	-	-	-	-
4	A ₂₂ №550 конц. культуральная сусп.	+	+	-	-	-	-
5	O ₁ №194 10% культур. суспензия	-	-	+	+	-	-
6	O ₁ №194 146S компоненты	-	-	+	+	-	-
7	O ₁ №194 лапинизированный	-	-	+	+	-	-
8	O ₁ №194 33% суспензия афт КРС	-	-	+	+	-	-
9	Азия-1 №48 10% культ. суспензия	-	-	-	-	+	+
10	Азия-1 №48 146S компоненты	-	-	-	-	+	+
11	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
12	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
13	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
14	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
15	суспензия КК ВИК-21	-	-	-	-	-	-
16	суспензия КК СИ	-	-	-	-	-	-

Представленные данные в таблице 10 показывают, что результаты, полученные с помощью ИФА соответствуют данным, полученным в РСК. На основании полученных результатов нами были проведены расчеты чувствительности и специфичности диагностического набора. Расчет проводили по методу «латинского квадрата» описанного Дудниковым С.А., 2005. Согласно расчетам чувствительность и специфичность данного набора составляет 100%

3. ВЫВОДЫ

- 1 Изучены иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 году, который отличается от вакцинных и ранее изученных эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1 (R% от 13 до 42), что необходимо учитывать при разработке мер профилактики ящура в России
- 2 Установлено, что вирус ящура Азия-1 штамм №1987/Амурский/2005 адаптируется к культуре клеток ВНК-21, IB-RS-2 и ПСГК-30 в течение трех пассажей Наибольшее накопление вируса происходит в культуре клеток IB-RS-2, в титре 7,66 Ig ТЦД₅₀/см³ (в количестве 1 мкг/см³ 146S +75S компонентов)
- 3 В опытах на морских свинках установлено, что в прививной дозе инактивированной вакцины из штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержится 42,5 ПД₅₀ к гомологичному возбудителю и 8,69 ПД₅₀ к вирусу Азия-1 №48 и Азия-1 Иран 58/99, а к Азия-1 /Шамир 3/89 – 37,04 ПД₅₀ В прививной дозе препарата из вируса Азия-1 Иран 58/99 содержалось 37,04 ПД₅₀ к гомологичному и 20,41 ПД₅₀ к Азия-1 №1987/Амурский/2005
- 4 В опытах на КРС установлено, что в прививной дозе коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов A22, O₁, Азия-1 №48 содержалось 10,56 ПД₅₀ против гомологичного возбудителя и 3,5 ПД₅₀ к вирусу Азия-1 №1987/Амурский/2005
- 5 Штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» и рекомендован для изготовления диагностических и вакцинных препаратов, как отличающийся по антигенным, иммуногенным и протективным свойствам от производственных и ранее выделенных эпизоотических штаммов

- 6 Получены диагностические препараты (антиген, гипериммунные сыворотки, улавливающие и детекторные антитела) для РСК и ИФА на вирус ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005
- 7 Оптимизированы параметры постановки ИФА с целью использования его при выявлении и идентификации вируса ящура в патологическом материале, полученном от больных животных
- 8 Усовершенствован диагностический набор, основанный на иммуноферментном анализе, для выявления и идентификации антигена вируса ящура в афтозном материале и суспензиях патологического материала

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются следующие материалы, полученные при выполнении диссертационной работы

- 1 Штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, пригодный для получения диагностикумов и вакцин, депонированный в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».
- 2 Специфические диагностические поликлональные антитела против вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 для использования в РСК и ИФА
- 3 Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным методом (ТУ 0388-138-00495527-2005 от 30 06 2006г)

5. Список опубликованных работ по материалам диссертации

1. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма №1737 Азия /Грузия/2000 вируса ящура / В.К Спирин, Т А Фомина, Н Е Камалова, С.Н. Фомина, А К Караулов // Золотое кольцо России : Матер 4 региональн конф , посвящен пробл профилактики и лечения домашних жив-х и птицы – Владимир, 2001. – С 51-52
- 2 Стандартизация методов выявления противоящурных антител в соответствии с требованиями МЭБ / Н Е Камалова, С.Н. Фомина, С.Р Кременчугская, Т А Фомина, Т Н Лезова, Л А Быкова // Актуальн пробл инфекц патологии жив-х матер Междунар. науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2003 – С 35-38
- 3 Результаты изучения иммунобиологических свойств эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в Закавказье / Т А Фомина, В К Спирин, А В Щербаков, А И Егорова, В В Дрыгин, С.Р Кременчугская, С.Н. Фомина // Актуальн пробл инфекцион патологии жив-х: матер Междунар науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2003 – С. 32-34
- 4 Результаты эпизоотологического и серологического мониторинга по ящуру в России в 2002г / В М Захаров, А М. Рахманов, Т А Фомина, В Н Герасимов, Н Е Камалова, С Р Кременчугская, А К Караулов, Д М Муминов, В В Никифоров, В Г Патрикесев, С.Н. Фомина // Актуальн вопр зоотехн науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья с.-х жив-х: матер 2-й Междунар науч -практ конф – Ставропль, 2003 – С 313-317
- 5 Foot-and-mouth disease virus type Asia-1 in Transcaucasia diagnosis and immunobiological properties / T.A. Fomina, V.M. Zakharov, V K Spirin, N.E. Kamalova, A V Scherbakov, S R Kremenchugskaya, S.N. Fomina // 6th Int Congr. Vet. Virol. Virus Persistence and Evolution Proc – Saint-Malo, France, 2003. – P. 120

6 Получение рекомбинантного неструктурного ЗА белка вируса ящура и его использование для дифференциации постинфекционных и поствакцинальных антител в непрямом варианте твердофазного ИФА / С.Н. Фомина, А С Яковлева, А В Щербаков, Т А Фомина, Н Е Камалова // Пробл монитор и генодиагност инфекцион бол ж- ных Матер Междунар науч конф молодых ученых, 24-26 марта 2004 г – Владимир, 2004 – С 67-68

7 Современные методы контроля иммуногенности противоящурных вакцин и оценки иммунитета / Н Е Камалова, С Р Кременчугская, В М Захаров, В И Диев, В Ю Кулаков, С.Н. Фомина, М В Жильцова // Сб науч тр ВГНКИ – М, 2005 – Т 66 – С 39-45

8 Разработка и применение иммуноферментной тест-системы для определения антител к неструктурным белкам вируса ящура /А В Щербаков, А С Яковлева, А В Каньшина, Н В Вавилова, С.Н. Фомина, С Р Кременчугская, Н С Мудрак // Тр Федерального центра охраны здоровья животных – Владимир, 2006 – Т 4 – С 26-39

9 Фомина С Н Комплексное изучение антигенного родства штаммов вируса ящура типа Азия-1 / С.Н. Фомина //Вет патология – 2006 - №4 – С 34-37