

ФУНТИКОВ Андрей Александрович

**АНТИГЕННЫЕ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭПИЗООТИЧЕСКИХ
ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА О, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2014 – 2019 ГГ.**

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Владимир – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Научный руководитель

Лозовой Дмитрий Анатольевич

доктор ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Официальные оппоненты:

Самуйленко Анатолий Яковлевич

академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, заместитель директора по бионанотехнологиям ФГБНУ ВНИТИБП

Капустина Ольга Владимировна

доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВО НГСХА)

Защита состоится _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, мкр. Юрьевец). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова
Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Вспышки ящура, вызванные вирусом типа О, регистрируют во многих странах Центральной Азии, Среднего Востока и Азиатско-Тихоокеанского региона, в том числе граничащих с Россией. Следовательно, угроза заноса ящура на территорию нашей страны существует постоянно, особенно в регионах, пограничных с Монголией, Китаем, странами Центральной Азии и Закавказья [Лозовой Д.А. и др., 2019].

Учитывая опасность заноса ящура в РФ и риск значительных экономических потерь, особое значение придается вопросу диагностики этой болезни. Согласно Кодексу здоровья наземных животных МЭБ, ящур относится к особо опасным инфекционным болезням. Исходя из этого, защита государства от заноса ящура и разработка мер оперативной диагностики, а также ликвидации вспышек является первостепенной задачей.

В феврале 2014 г. ящур, вызванный вирусом серотипа О, был отмечен в Корейской Народной Демократической Республике (КНДР), а в июле 2014 г. 6 вспышек ящура, обусловленных этим типом вируса, были выявлены также в Республике Корея. Заболевание регистрировали среди свиней. По данным Всемирной справочной лаборатории МЭБ по ящур (WRLFMD, Пербрайт, Великобритания), это был новый занос вируса О/SEA/Mya-98, отличающегося от возбудителя предыдущих вспышек 2010 – 2011 гг. [WRLFMD, 2015].

В 2015 г. вирус ящура (ВЯ) серотипа О выявляли в Республике Корея (в 159 очагах) и в Монголии (в 6 очагах). В 2016 г. вспышки заболевания, вызванные возбудителем этого серотипа, также отмечали в Китае (4 очага) и Российской Федерации (3 очага).

В 2017 – 2018 гг. в Китае, Республике Корея и Монголии было зарегистрировано более 130 очагов ящура, вызванных вирусом типов А и О, преобладающее большинство вспышек было обусловлено серотипом О [WRLFMD, 2018].

Учитывая тот факт, что на территории стран Азиатско-Тихоокеанского региона и Центральной Азии возникают очаги, обусловленные ВЯ различных генотипов, существует необходимость своевременного выделения, изучения биологических свойств и идентификации изолятов ВЯ, вызвавших вспышки на территории РФ, сопредельных и опосредованно граничащих стран, в последние годы (2014 – 2019 гг.) с целью подготовки новых производственных штаммов для лабораторной диагностики и создания противоящурных вакцин.

1.2 Степень разработанности проблемы. Проблемам распространения, диагностики и профилактики ящура посвящены многочисленные отечественные и зарубежные работы. Выявление антигена ВЯ проводят в реакции связывания комплемента (РСК) и методом иммуноферментного анализа (ИФА). Вирусный геном определяют методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для выделения ВЯ

используют первично трипсинизированные и перевиваемые культуры клеток. Разработаны наборы для выявления антигена ВЯ, постинфекционных и поствакцинальных противоящурных антител в сыворотках крови животных для постановки ИФА [Щербаков А.В. и др., 2002, Камалова Н.Е. и др., 2005 – 2008, Луговская Н.Н. и др., 2010]. Ввиду высокой изменчивости ВЯ возникает необходимость изучения новых изолятов, выделенных в эпизоотических очагах с целью выбора и получения актуальных для диагностики и профилактики ящура.

1.3 Цель и задачи исследований. Цель исследований – изучение антигенных и иммуногенных свойств эпизоотических изолятов ВЯ типа О для выбора актуальных производственных штаммов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить эпизоотическую ситуацию по ящуру в РФ, в сопредельных и опосредованно граничащих государствах;
- изучить культуральные свойства эпизоотических изолятов ВЯ, выделенных при вспышках ящура в 2014 – 2019 гг.;
- изучить филогенетические и антигенные свойства изолятов ВЯ типа О, выделенных при вспышках в 2014 – 2019 гг.;
- обосновать к использованию актуальные штаммы ВЯ для изготовления диагностических и вакцинных препаратов;
- внедрить применение полученных вирусспецифических препаратов на основе изученных штаммов вируса для оценки иммуногенных свойств инактивированных вакцин;
- разработать методические рекомендации для получения 146S-компонента и гипериммунных сывороток с использованием исследуемых штаммов;
- изготовить диагностические компоненты с использованием актуальных штаммов ВЯ для реакции связывания комплемента и иммуноферментного анализа.

1.4 Научная новизна результатов исследований. Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований:

- изучены культуральные свойства изолятов ВЯ О №2383/Приморский/2019 и О №2409/Забайкальский/2019;
- изучены основные антигенные свойства ВЯ изолятов О №2271/Корея/2014 и О №2344/Монголия/2017 с последующим их депонированием в Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»;
- выявлены особенности культивирования ВЯ О №2271/Корея/2014 в монослойной перевиваемой культуре клеток ПСГК-30;
- установлены антигенные и филогенетические отношения между производственными штаммами и эпизоотическими изолятами ВЯ типа О, выделенными в 2014 – 2019 гг.;

– оптимизированы условия для получения типоспецифических компонентов для ИФА и РСК на основе штаммов ВЯ О №2344/Монголия/2017, О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014;

– изучены иммуногенные свойства вакцин из штаммов ВЯ О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014.

Научная новизна полученных результатов послужила основанием подготовки пакета документов для оформления заявки на патент «Штамм О №2344/Монголия/2017 вируса ящура *Apftae epizooticae* типа О для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О». Заявка принята к рассмотрению Роспатентом 6 мая 2019 г.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы. С использованием данных по изучению эпизоотической ситуации по ящуру в странах, граничащих с РФ, принято участие в составлении «Прогноза по ящуру сельскохозяйственных животных в Российской Федерации на 2018 г.», который позволил в полной мере анализировать и прогнозировать эпизоотическую ситуацию по ящуру в странах, граничащих с РФ, а также корректировать профилактические мероприятия в угрожаемых по ящуру регионах РФ.

Подготовлены производственные штаммы ВЯ О №2271/Корея/2014 и О №2344/Монголия/2017, депонированные в Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В результате проведенных исследований по оптимизации условий для получения диагностических вирусспецифических препаратов разработаны и внедрены «Методические рекомендации по получению штаммоспецифических гипериммунных сывороток для диагностики ящура в ИФА», утвержденные директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 10.01.2019. Методические рекомендации могут быть использованы при производстве диагностических наборов на разных этапах технологического процесса.

1.6 Методология и методы исследования. Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно-восприимчивых к ящуру животных. В работе использовали вирусологические (вирусовыделение, титрование вируса), молекулярно-биологические (ПЦР-РВ, секвенирование), серологические (РН, РСК) и иммунохимические методы (непрямой сэндвич-вариант (сИФА) и жидкофазный блокирующий (жбсИФА), а также физико-химические (составление растворов заданной молярности, ультрацентрифугирование (УЦФ), электрофорез в ПААГ) и другие методы.

1.7 Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

– антигенное и филогенетическое родство эпизоотических изолятов ВЯ О №2271/Корея/2014 и О №2383/Приморский/2019 с производственным штаммом О №2212/Приморский/2014; филогенетическое родство изолятов

О №2344/Монголия/2017 и О №2409/Забайкальский/2019, свидетельствующее о распространении в странах Азиатско-Тихоокеанского региона, граничащих с РФ, генетических линий вируса ящура Муа-98 и Ind-2001;

– эпизоотические изоляты ВЯ О №2271/Корея/2014, О №2383/Приморский/2019 и О №2344/Монголия/2017, О №2409/Забайкальский/2019, адаптированные к культурам клеток, стабильно сохраняют инфекционную активность при последовательном пассировании;

– типоспецифические диагностические препараты на основе штаммов ВЯ О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014 могут быть применимы для обнаружения и типирования изолятов, выделяемых в эпизоотических очагах;

– результаты практического применения штаммов ВЯ О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014 при контроле противоящурных вакцин.

1.8 Личный вклад соискателя. Основным объемом исследований выполнен автором самостоятельно. При выполнении отдельных этапов работ практическую и консультативную помощь оказывали сотрудники референтной лаборатории диагностики ящура, референтной лаборатории по особо опасным болезням, лаборатории профилактики ящура, отдела биологического и технологического контроля и коллекции штаммов микроорганизмов, за что автор выражает им глубокую признательность.

1.9 Степень достоверности и апробация результатов работы. Основные положения диссертации были изложены на заседаниях ученого совета ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2016 – 2019 гг., на IV Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», г. Владимир, 2016 г.

Достоверность проведенных исследований подтверждена статистической обработкой результатов опытов и проведением комиссионных испытаний.

1.10 Публикации результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 4 научных работы, в том числе 2 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для докторских и кандидатских диссертаций.

1.11 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, список использованной литературы, практические предложения и приложения. Список литературы включает 133 источника, из них 64 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 29 таблицами, 8 рисунками. В приложении к диссертации представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты исследований и их внедрение.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

Вирусный материал. В работе использовали штаммы ВЯ, выделенные из афт от больных и экспериментально зараженных естественно–восприимчивых животных, а также репродуцированные в культурах клеток СП, ВНК-21, ПСГК-30, IB-RS-2.

Производственные штаммы ВЯ: А₂₂/Ирак/64; А №2269/ВНИИЗЖ/2015; А №2187/Кути/13; А №2029/Турция/06 (А/Иран/05); О₁/Manisa; О₁/Campos; О №2102/Забайкальский/2010; О/Саудовская Аравия/2008 (О/PanAsia2); О №1734/Приморский/2000; О №2222/Тайвань/2012; О Тайвань 3/97; Азия-1 №1960/Таджикистан/2004; Азия-1 /Шамир 3/89.

Производственный штамм ВЯ О №2212/Приморский/2014 использовали для сравнения при изучении культуральных, антигенных и иммуногенных свойств эпизоотических изолятов.

Эпизоотические изоляты: О №2271/Корея/2014; О №2344/Монголия/2017; О №2383/Приморский/2019; О №2409/Забайкальский/2019.

Вакцины. В работе использовали культуральные инактивированные эмульсионные и универсальные сорбированные вакцины против ВЯ типа О, изготовленные в моно-, бивалентных вариантах в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Естественно-восприимчивые животные. В опытах использовали клинически здоровых свиней 3–4 месячного возраста крупной белой породы, массой 35–40 кг. Животные были получены из хозяйств Владимирской области, благополучных по инфекционным болезням.

Получение штаммоспецифических сывороток проводили на клинически здоровых морских свинках массой 400–450 г и кроликах массой 2,5–3,0 кг.

Культуры клеток. При получении культурального вирусного материала использовали перевиваемые линии культур клеток ПСГК-30, ВНК-21 и IB-RS-2, а также первично трипсинизированную культуру клеток почки поросят (СП) со сформированным плотным монослоем без признаков деструкции клеток. Клеточные культуры использовали в качестве чувствительной тест-системы для адаптации, репродукции, титрования вируса и для постановки реакции микронеутрализации.

Питательные среды. В работе использовали питательные среды Игла, ПСС, ПСП, 0,5% гидролизат лактальбумина (ГЛА) на растворе Эрла или Хенкса.

Культуры клеток получали из сектора культивирования клеточных культур ФГБУ «ВНИИЗЖ».

2.2 Методы исследований

Определение типа ВЯ в образцах патматериала. Выделение и титрование ВЯ с использованием чувствительных культур клеток, выявление возбудителя в пробах методом РСК и ИФА осуществляли согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002.

В работе был использован «Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Культивирование вируса ящура в клеточных культурах. Содержимое и стенки афт, полученные от больных или экспериментально зараженных животных, растирали с нейтральным битым стеклом до гомогенного состояния. Готовили 10% суспензию на ФБР рН 7,4–7,6. Суспензию очищали путем добавления трихлорметана 10% от общего объема с последующим центрифугированием при 9000 g в течение 20 мин. Надосадов использовали для инфицирования клеточных культур.

Выращивание вируса проводили в монослое клеточных культур в плоских стеклянных и пластиковых сосудах емкостью от 50 до 1500 см³.

Реакция нейтрализации. РН проводили в культуре клеток СП на питательной среде ПСП. Учет результатов осуществляли через каждые 24 ч. Результаты титрования ВЯ и титры противоящурных антител в сыворотке крови вакцинированных животных учитывали по характерному ЦПД. Реакцию выполняли согласно «Методическим указаниям по постановке реакции нейтрализации для определения иммунного статуса животных при ящуре», утвержденным Главветупром МСХ СССР 26.12.1983.

Реакция микронейтрализации. РМН ставили на планшетах фирмы «Costar» микрометодом, согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002. В реакции определяли титры противоящурных антител в сыворотке крови вакцинированных животных. Минимальным считали титр сыворотки 1,68 lg.

Изучение антигенного родства (матчинг) в РМН выполняли согласно «Методическим рекомендациям по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронейтрализации», утвержденным директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 16.11.2012.

Значение r_1 вычисляли по формуле:

$$r_1 = \frac{\text{Титр референтной сыворотки с эпизоотическим изолятом}}{\text{Титр референтной сыворотки с производственным штаммом}}$$

Значение r_1 в РМН:

$\geq 0,30$ – штаммы ВЯ антигенно родственны, производственный штамм будет защищать от полевого изолята;

$< 0,30$ – штаммы ВЯ антигенно отличаются, производственный штамм не будет защищать от полевого изолята

Титрование ВЯ микрометодом. Титрование вируса проводили методом 10-кратных разведений вирусной суспензии на питательной среде Игла и внесения в двух повторностях в лунки микропланшета, в которые затем добавляли суспензию перевиваемой культуры клеток IB-RS-2. Учет результатов осуществляли через 72 ч. Результаты титрования ВЯ учитывали по характерному ЦПД. Титр биологической активности штамма рассчитывали по методу Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Определение филогенетического родства. Исследования проводили совместно с сотрудниками референтной лаборатории по особо опасным болезням согласно «Методическим указаниям по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1», утвержденным директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 21.01.1997.

Подготовка производственных штаммов ВЯ для определения иммуногенной активности противоящурной вакцины на естественно-восприимчивых животных. Заражение свиней вирусом ящура проводили с применением метода внутрикожных инъекций в область венчика копытец в 4 точки по 0,1 см³, последующие пассажи проводили 10% вирусной суспензией, полученной из афтозного материала предыдущего пассажа. Проявление клинических признаков ящура учитывали на следующие сутки после заражения и далее через каждые 6 ч по наличию созревших афт на месте введения вирусного материала.

Титрование 10%-ной суспензии ВЯ из афт с глицерином (āā) осуществляли в соответствии с СТО 00495527-0130-2009 «Штаммы вируса ящура от свиней контрольные».

Учет титрования вируса на свиньях производили через 24–48 ч по наличию афт на месте введения разведений вирусосодержащего материала. Титр инфекционной активности выражали в lg ИД₅₀/0,1 см³.

Исследования проводили совместно с сотрудниками лаборатории профилактики ящура и отдела биологического и технологического контроля и коллекции штаммов микроорганизмов.

Получение антигенов ВЯ для ИФА и РСК. Инактивированную культуральную жидкость, полученную из вакцинного сырья, содержащую антиген ВЯ, осветляли в течение 30 мин при 9000 g и температуре 4°C на центрифуге типа Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, USA).

Добавляли ПЭГ 8% м.м. 6000 от общего объема, перемешивали и выдерживали при 4°C в течение 24 ч. Вирусную суспензию осаждали при 9000 g в течение 60 мин, осадок растворяли в ФБР, концентрируя к 1/100 от первоначального объема. Добавляли трихлорметан 50% от общего объема, фракционировали в течение 30 мин при 18000 g. Отбирали верхнюю водную фракцию. Антиген ВЯ хранили до дальнейшего использования при температуре 4°C с добавлением сахарозы в объеме 5% от общей массы. Перед внесением в градиент сахарозы к антигену ВЯ добавляли 10% раствор детергента Nonidet P-40 (NP-40) из расчета 1/10 объема суспензии.

Выделение 146S-компонента. Для выделения 146S-компонента готовили линейный градиент из растворов сахарозы в концентрации от 10 до 50% с шагом 10%. Обработанный NP-40 антиген ВЯ вносили в центрифужные пробирки, последовательно подслаивали растворы сахарозы, начиная с 10% раствора, центрифугировали при 4°C в течение 4 ч при 110000g. Отбор фракций производили с

помощью перистальтического насоса. Оптическую плотность каждой фракции определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм в цельном виде и в разведении 1:10. При помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel для каждого образца антигена рассчитывался седиментационный профиль.

По результатам анализа построенного седиментационного профиля отбирали фракции с наибольшей оптической плотностью. 146S-компонент пересаждали методом УЦФ в течение 4 ч со скоростью 110000g при температуре 4°C и ресуспендировали осадок в ФБР.

Получение гипериммунных сывороток. Животных иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом 21 сут. Антиген с концентрацией белка 15–20 мкг на морскую свинку вводили в объеме 0,5 см³ и с концентрацией белка 50 мкг на кролика в объеме 0,7 см³. Для первой иммунизации использовали эмульсию антигена в равных количествах с полным адъювантом Фрейнда, для второй – с неполным адъювантом Фрейнда. Животных обескровливали через 10 сут после второй иммунизации.

Кровь у кроликов для исследования отбирали из ушной вены в стерильные одноразовые вакуумные пробирки, кровь от морских свинок – из сердца. Сыворотку отделяли от сгустка в стерильные стаканы и центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин, надосадок отбирали, расфасовывали в необходимых объемах и хранили при температуре минус 20°C до использования.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты исследований статистически обрабатывали в программе для работы с электронными таблицами Microsoft Office Excel.

2.3 Результаты исследований

2.3.1 Анализ эпизоотической ситуации по ящуру в странах Азиатско-Тихоокеанского региона и Российской Федерации в 2014 – 2019 гг.

На территории Приморского края в с. Прохоры Спасского района 17 мая 2014 г. были диагностированы первые случаи заболевания свиней, обусловленные ВЯ типа О. В общей сложности в 2014 г. в Спасском районе было зарегистрировано десять очагов инфекции. По данным МЭБ, в зараженных хозяйствах из 20045 свиней 14874 заболело, 4211 пало, 15833 убито и уничтожено, 1 свинья убита на бойне. У 18 голов КРС клинических признаков заболевания не было обнаружено [WANIS, 2014].

В феврале 2014 г. ящур, вызванный вирусом типа О, был отмечен в КНДР. В июле 2014 г. в МЭБ было сообщено о первых вспышках ящура среди свиней на территории Республики Корея. Всемирная справочная лаборатория МЭБ по ящуру подтвердила новый занос в провинцию Бьян-Мьен ВЯ типа О, относящегося к топотипу SEA линии Муа-98, но отличающегося от вируса из вспышек в Республике Корея в 2010 – 2011 гг. По данным Всемирной справочной лаборатории МЭБ по ящуру корейские изоляты были антигенно родственны штаммам ВЯ О/3039, О/Tur/5/094 и О/Тайвань/98, но антигенно отличались от штаммов О₁/Маниса и О/Индия Р3/75. Тем

не менее, с января по март 2015 г. было зарегистрировано более 100 вспышек болезни среди поголовья свиней на фоне вакцинации препаратами, в состав которых входил штамм О₁/Маниса. С 3 декабря 2014 г. по 28 апреля 2015 г. среди свиней и КРС было зарегистрировано 185 вспышек и уничтожено свыше 160 тыс. животных. С мая 2015 г. вспышек в регионе не наблюдали, 2 новых очага были зарегистрированы на свиноферме в провинции Чолла-Пукто на Юго-Западе республики в конце 2015 г. В начале 2016 г. ветеринарной службой Республики Корея было уничтожено порядка 11 тыс. свиней. Вспышка ящура на территории республики была ликвидирована только в 2018 г.

В ноябре – декабре 2016 г. очаги ящура были зафиксированы среди свиноголовья и КРС в пос. Падь-Широкая Приаргунского района, с. Среднеаргунск и пос. Кайластуй Краснокаменского района Забайкальского края. Вирус, вызвавший заболевание, относился к генетической линии O/Ind-2001, которая ранее никогда не регистрировалась в России и на территории стран СНГ. Предположительно, вирус был занесен из КНР или Монголии. По сообщению японских исследователей, вирус этой генетической группы уже был выявлен у больного КРС в Монголии в марте 2015 г. (аймак Баян-Улгий) [GenBank LC320038]. Следовательно, вирус данной генетической линии видимо несколько лет циркулировал в Восточной Азии в непосредственной близости от границы РФ.

В 2015 – 2017 гг. на территории Монголии среди КРС, овец и коз циркулировал ВЯ типа О разных топотипов и генетических линий: O/SEA/Mya-98, O/ME-SA/PanAsia, O/ME-SA/Ind-2001 [WRLFMD, 2017].

В начале 2019 г. в Приморском крае была зафиксирована одна из наиболее масштабных вспышек ящура среди свиней. Первые очаги были выявлены в Михайловском районе 1 января 2019 г. Болезнь быстро распространилась по региону и уже к концу января 2019 г. было отмечено 15 очагов, в том числе девять – в Спасском районе, три – в Октябрьском районе, один – в Лесозаводском районе и один – в Уссурийском районе. 5 февраля 2019 г. были опубликованы распоряжения об установлении карантина и изъятии животных в подсобных хозяйствах этих районов. Один очаг был зафиксирован в соседнем Хабаровском крае в пос. Дружба Хабаровского района. На момент регистрации вспышки на предприятии с поголовьем 1751 животных, клинические признаки заболевания были обнаружены у 159 голов. В общей сложности, в результате ликвидации вспышек в Приморском и Хабаровском краях из 77607 свиней 75381 заболело, 1245 пало, 76362 убито и уничтожено.

В феврале 2019 г. среди КРС и свиней в личном подсобном хозяйстве пос. Кайластуй Краснокаменского района Забайкальского края был выявлен очаг ящура. По данным МЭБ, на территории края заболело 33 головы КРС, 6 голов МРС, убиты и уничтожены 1307 животных. Ящур был купирован в первичном очаге.

Исходя из анализа эпизоотической ситуации по ящуру в странах Азиатско-Тихоокеанского региона и на территории РФ, можно сделать вывод, что в последнее

время очаги ящура наиболее часто регистрировались на территории Дальневосточного федерального округа. Территории Приморского, Хабаровского и Забайкальского краев и Амурской области находятся в непосредственной близости от границ стран, неблагополучных по ящуру (КНР, КНДР, Республика Корея и Монголия). Так, предприятие, на котором в 2019 г. была зафиксирована первая вспышка ящура, вызванная ВЯ типа О в Приморском крае, находится в 27 км от провинции Дунан, КНР. Анализ нуклеотидных последовательностей эпизоотических изолятов ВЯ, выделенных на территории Дальневосточного и Сибирского федеральных округов, а также их сравнение с изолятами, обнаруженными на территориях КНР, КНДР, Республики Корея и Монголии, свидетельствует о заносе ящура, вызванного возбудителем серотипа О генетических линий Муа-98 и Ind-2001, на территории РФ со стороны стран Азиатско-Тихоокеанского региона.

2.3.2 Изучение культуральных свойств изолятов ВЯ типа О

При поступлении патологического материала на исследование в референтную лабораторию диагностики ящура в первую очередь проводили выявление и типирование антигена вируса. Затем адаптировали вирус к культурам клеток СП, ПСГК-30, IB-RS-2 и ВНК-21 с последующим типированием в серологических и иммунохимических реакциях.

Результаты адаптации ВЯ штамма О №2212/Приморский/2014, используемого для сравнения в качестве эталонного, и эпизоотических изолятов ВЯ О №2344/Монголия/2017, О №2383/Приморский/2019, О №2409/Забайкальский/2019 к различным клеточным культурам свидетельствуют о высокой адаптационной способности изолятов к использованным клеточным культурам. Штамм ВЯ О №2212/Приморский/2014, используемый для сравнения при репродукции в КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 в третьем пассаже вызывал проявление ЦПД через 20–24 ч. Наиболее высокие показатели титра инфекционной активности – $7,50 \pm 0,25 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ и активности антигена в РСК 1:4 были установлены через 13–18 ч после проведения второго последовательного пассажа вируса в КК ВНК-21. Изолят О №2344/Монголия/2017 при репродукции в КК ВНК-21, ПСГК-30 и IB-RS-2 к пятому пассажу вызывал проявление ЦПД через 24–20 ч. Наиболее высокие показатели титра инфекционной активности – $6,25 \pm 0,05 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ и активности антигена в РСК 1:4 были установлены через 20 ч после проведения пятого последовательного пассажа вируса в КК ВНК-21. Изолят О №2409/Забайкальский/2019 при репродукции в КК ПСГК-30 и IB-RS-2 к пятому пассажу вызывал проявление ЦПД через 36–18 ч. Наиболее высокие показатели титра инфекционной активности – $6,00 \pm 0,25 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ и активности антигена в РСК 1:2 были установлены через 18 ч после проведения пятого последовательного пассажа вируса в КК IB-RS-2. Изолят О №2383/Приморский/2019 при репродукции в КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 к пятому пассажу вызывал проявление ЦПД через 24–18 ч. Наиболее высокие показатели титра инфекционной активности – $6,00 \pm 0,25 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ и активности антигена в РСК 1:4

были установлены через 18 ч после проведения пятого последовательного пассажа вируса в КК IB-RS-2 и ПСГК-30.

Наиболее детально были исследованы 6 изолятов, поступившие из Республики Корея. Начиная с первого пассажа, изоляты О №2271/Корея/2014 вызывали ЦПД в культурах клеток ПСГК-30 и IB-RS-2 в течение 15–24 ч. Вирус, адаптированный к культуре клеток ПСГК-30, был использован для заражения суспензии клеток ВНК-21 с целью получения антигена для изготовления экспериментальной серии вакцины, а также для гипериммунизации морских свинок с целью получения диагностических вирусспецифических антител.

Данные по определению инфекционной и антигенной активности изолятов, адаптированных к культуре клеток ПСГК-30, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Инфекционная и антигенная активность изолятов ВЯ, поступивших из Республики Корея, адаптированных к культуре клеток ПСГК-30

n=3

Характеристика	Название изолятов					
	О/KOR/JC 35/2015	О/KOR/JC 71/2015	О/KOR/JC8 4/2015	О/KOR/JC0 2D1/2014 (02 D1-11)	О/KOR/JC 02D1/2014 (02 D1-2)	О/KOR/JC 02D6/2014
Биологическая активность						
Титр инфекц. активности в КК IB-RS-2 (lgТЦД ₅₀ /см ³)	6,58±0,14	6,67±0,14	7,17±0,28	7,50±0,17	7,25±0,25	6,75±0,25
Титр антигенной активности в ИФА (разведения)	1:16	1:32	1:32	1:16	1:256	1:32

Из результатов, представленных в таблице 1, следует, что титры инфекционной активности изолятов, репродуцированных в культуре клеток ПСГК-30, находились в пределах 6,58±0,14 – 7,50±0,17lg ТЦД₅₀/см³, а их антигенная активность в ИФА составляла 1:16 – 1:256. При этом наивысшую антигенную активность в разведении 1:256 проявлял изолят О/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-2) при титре инфекционной активности 7,50±0,17 lg ТЦД₅₀/см³. В связи с этим, данный изолят был выбран для дальнейших исследований и был обозначен, как О №2271/Корея/2014.

2.3.3 Изучение стабильности штаммов ВЯ при последовательных пассажах

При испытании было проведено 5 последовательных пассажей штамма ВЯ О №2212/Приморский/2014, взятого для сравнения, и изолятов ВЯ О №2344/Монголия/2017; О №2409/Забайкальский/2019, О №2383/Приморский/2019 и О №2271/Корея/2014 в перевиваемой КК IB-RS-2 с определением биологической активности вируса каждого пассажа.

Результаты изучения стабильности штаммов по их биологической активности в течение 5 пассажей показали, что все исследуемые образцы ВЯ в течение 5 последовательных пассажей проявили стабильно высокую инфекционную активность, которая с 3 по 5 пассаж находилась в пределах 4,96 – 6,50 lg ТЦД₅₀/см³.

Для последующего использования изолята ВЯ О №2271/Корея/2014 в производстве биопрепаратов был проведен опыт по изучению его стабильности при проведении 5 последовательных пассажей в перевиваемой КК ПСГК-30. С целью изучения стабильности вируса при репродукции каждый пассаж титровали в перевиваемой КК IB-RS-2. Результаты изучения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Инфекционная активность изолята ВЯ О №2271/Корея/2014 при репродукции в КК ПСГК-30

n=3

Пассаж	Срок наступления ЦПД, час	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	24±2	6,33±0,14
2	24±2	7,16±0,38
3	20±2	7,08±0,28
4	18±2	6,00±0,25
5	18±2	6,41±0,14

Из таблицы 2 видно, что изолят ВЯ О №2271/Корея/2014 в течение 5 последовательных пассажей в культуре клеток ПСГК-30 проявил стабильно высокие титры инфекционности, составляющие 6,00±0,25 – 7,16±0,38 lg ТЦД₅₀/см³, при уменьшении срока проявления ЦПД с 24 до 20–18 ч с 3 по 5 пассажи.

2.3.4 Оптимизация условий культивирования производственного штамма вируса ящура О №2271/Корея/2014

Следующей задачей было оптимизировать условия культивирования производственного штамма вируса ящура О №2271/Корея/2014 и в дальнейшем использовать эти данные при масштабной репродукции с целью получения диагностических и вакцинных препаратов.

Из числа методов, описанных в литературных источниках по успешной адаптации вируса ящура с целью репродукции в КК, был избран метод подбора разведений ВЯ для инфицирования КК. В 6 пластиковых матрасов 25 см² с монослойной культурой клеток ПСГК-30 вносили разведения вируса ящура от 10⁻¹ до 10⁻⁶ на поддерживающей среде ПСС и инкубировали при 37°С. Данные по изучению антигенной активности расплодов вируса, полученных при подборе разведений ВЯ для заражения, в ИФА представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Антигенная активность вируса ящура О №2271/Корея/2014 при заражении культуры клеток ПСГК-30 различными разведениями

Разведения вируса для заражения	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Время наступления ЦПД (ч)	15–18	21	24	27	30	30
Титр антигенной активности в ИФА (разведение)	1:64	1:64	1:256	1:64	1:64	1:32

Из таблицы 3 следует, что полное ЦПД наблюдали через 15–18 ч после заражения вирусом в разведении 10⁻¹, через 21–27 ч после внесения разведений вируса 10⁻²-10⁻⁴ и через 30 ч – разведений 10⁻⁵-10⁻⁶. При внесении разведения 10⁻³ время наступления ЦПД увеличивалось до 24 ч, при этом антигенная активность вируса в ИФА возрастала до 1:256, что превышало этот показатель при использовании других разведений. В связи с этим для культивирования ВЯ в культуре клеток ПСГК-30 в матрасах емкостью 1500 см³ с целью получения антигена ВЯ было выбрано разведение 10⁻³.

2.3.5 Выделение и адаптация вируса на естественно-восприимчивых животных

В условиях виварного корпуса ФГБУ «ВНИИЗЖ» была проведена реизоляция ВЯ О №2212/Приморский/2014, О №2271/Корея/2014 на свиньях. Заражение свиней проводили изолятом ВЯ О №2271/Корея/2014 и штаммом ВЯ О №2212/Приморский/2014, адаптированными к культуре клеток ПСГК-30 на уровне 2–3 пассажей. В первом пассаже изолята О №2271/Корея/2014 развитие афт отмечали только через 52 ч после заражения, при этом у животных первичные афты отсутствовали. Наличие вторичных афт было отмечено на копытном мякише и в области уголков губ. При внешнем осмотре было установлено наличие общей слабости, повышение температуры тела и отказ от корма. При проведении второго пассажа первичные афты были выявлены через 36 ч после заражения, у свиней также наблюдали признаки генерализации. При проведении 3 пассажа ВЯ О №2271/Корея/2014 развитие первичных афт на месте введения вируса наступило через 24 ч, наблюдали их значительное увеличение с наличием большого количества афтозной лимфы.

ВЯ О №2212/Приморский/2014 во 2 пассаже вызывал образование первичных афт на месте введения через 24 ч.

Из отобранного на каждом последующем пассаже вирусного материала готовили 10% суспензию с глицерином для определения инфекционной активности на свиньях и в культуре клеток IB-RS-2, в также антигенной активности в ИФА. Титр инфекционной активности ВЯ О №2212/Приморский/2014 в виде 10% суспензии из афт 2 пассажа на свиньях составил 4,80 lg ИД₅₀/0,1см³.

Титр инфекционной активности изолята ВЯ О №2271/Корея/2014 в культуре клеток существенно не изменялся при пассировании вируса на свиньях и находился в пределах $6,58 \pm 0,14 - 7,58 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Титр инфекционной активности вируса 3 пассажа на свиньях составил $5,50 \pm 0,25 \lg \text{ИД}_{50}/0,1\text{см}^3$. Вирус был типоспецифичен и активен в ИФА в разведении 1:256.

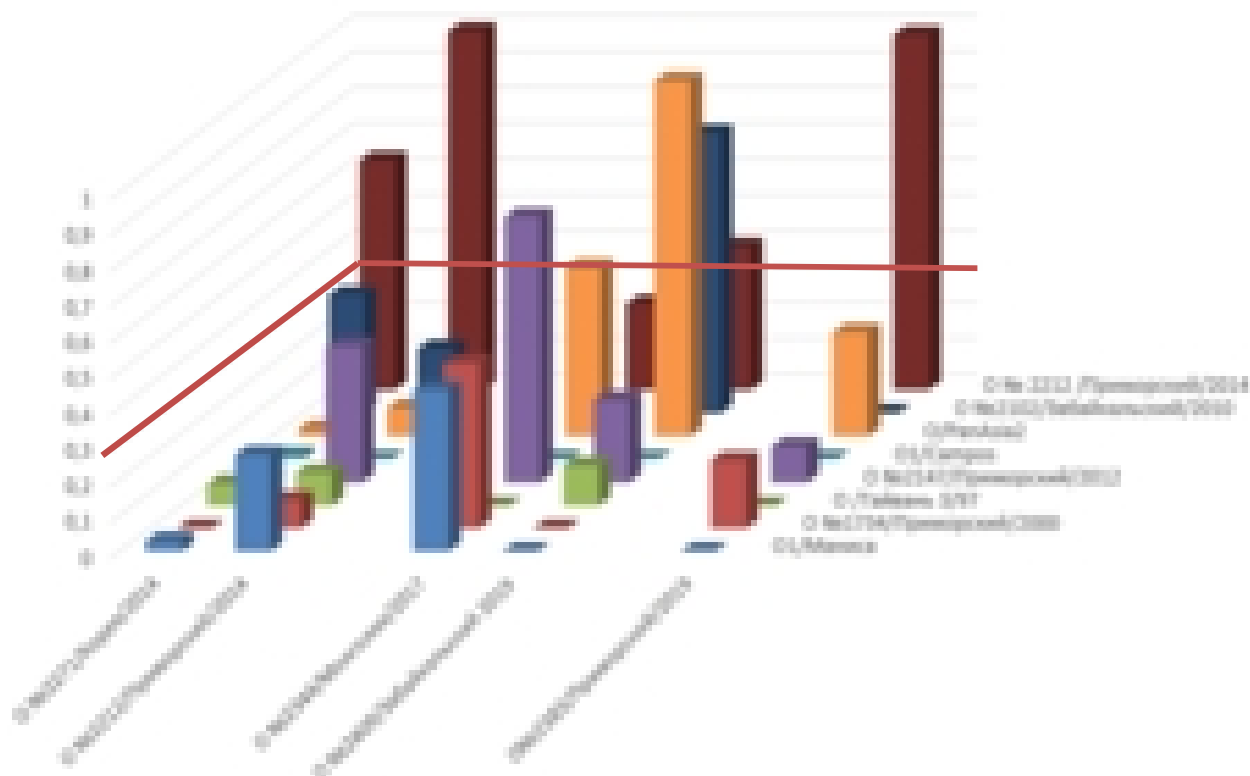
2.3.6 Генетическая принадлежность штаммов

Филогенетические взаимоотношения штаммов и изолятов ВЯ типа О изучали совместно с сотрудниками референтной лаборатории по особо опасным болезням.

Изучение первичной структуры участка генома методом нуклеотидного секвенирования показало, что штамм ВЯ О №2212/Приморский/2014 и изоляты ВЯ О №2271/Корея/2014, О №2383/Приморский/2019 принадлежат к топотипу SEA (Юго-Восточная Азия). Изоляты ВЯ О №2344/Монголия/2017 и О №2409/Забайкальский/2019 принадлежат к топотипу ME-SA (Ближний Восток – Южная Азия) генетической линии Ind-2001.

2.3.7 Определение антигенного родства в реакции микронеutralизации

В реакции микронеutralизации исследовали образцы ВЯ О №2212/Приморский/2014, О №2344/Монголия/2017, О №2409/Забайкальский/2019, О №2383/Приморский/2019, О №2271/Корея/2014 со специфическими сыворотками, полученными на производственные штаммы ВЯ О₁/Manisa, О₁/Campos, О Тайвань 3/97, О №1734/Приморский/2000, О/PanAsia2, О №2102/Забайкальский/2010 и О №2147/Приморский/2012.



Примечание: $r_1 \geq 0,30$ – изолят и производственный штамм антигенно родственны;

$r_1 < 0,30$ – изолят отличается в антигенном отношении от производственного штамма

Рисунок 1 - Антигенное соответствие (r_1) исследуемых изолятов ВЯ типа О производственным штаммам в РМН

Штамм ВЯ О №2212/Приморский/2014 существенно отличался от производственных штаммов О/PanAsia2 ($r_1=0,08$), О №1734/Приморский/2000 ($r_1=0,08$), О №2102/Забайкальский/2010 ($r_1=0,18$), О₁ Маниса ($r_1=0,27$) и О Тайвань 3/97 ($r_1=0,09$), и имел невысокий показатель антигенного родства со штаммом О №2147/Приморский/2012 ($r_1=0,38$).

Изолят ВЯ О №2271/Корея/2014 антигенно отличался от производственных штаммов О₁/Маниса ($r_1=0,03$), О/Тайвань 3/97 ($r_1=0,06$), О₁/Campos ($r_1=0,01$), О/PanAsia2 ($r_1=0,02$), но имел антигенное родство с отечественными штаммами О №2102/Забайкальский/2010 ($r_1=0,33$) и О №2212/Приморский/2014 ($r_1=0,64$).

Изолят ВЯ О №2383/Приморский/2019 существенно отличался от производственных штаммов О/PanAsia2 ($r_1=0,29$), О №1734/Приморский/2000 ($r_1=0,19$) и О №2147/Приморский/2012 ($r_1=0,10$) и обладал значительным антигенным родством со штаммом О №2212/Приморский/2014 ($r_1=0,99$).

Следовательно, генетически близкородственные изоляты, принадлежащие к топотипу SEA (Юго-Восточная Азия) ВЯ типа О генетической линии Муа-98, обладали выраженным антигенным родством.

Изолят ВЯ О №2344/Монголия/2017 отличался от штамма О №2212/Приморский/2014 ($r_1=0,24$) и обладал антигенным родством со штаммами О №2147/Приморский/2012 ($r_1=0,74$), О₁/Маниса ($r_1=0,45$), О №1734/Приморский/ 2000 ($r_1=0,46$) и О/PanAsia2 ($r_1=0,47$).

Изолят ВЯ О №2409/Забайкальский/2019 имел максимальное антигенное родство с производственным штаммом О/PanAsia2 ($r_1=0,99$), а также со штаммами О №2102/Забайкальский/2010 ($r_1=0,78$) и О №2212/Приморский/2014 ($r_1=0,40$).

Таким образом, изоляты ВЯ О №2344/Монголия/2017 и О №2409/Забайкальский/2019, принадлежащие к топотипу ME-SA (Ближний Восток - Южная Азия) генетической линии Ind-2001, имели наиболее выраженное антигенное родство с производственными штаммами топотипа ME-SA О №2147/Приморский/2012 и О/PanAsia2 соответственно, что свидетельствует об актуальности данных штаммов для профилактической вакцинации и борьбы со вспышками ящура.

2.3.8 Получение гипериммунных сывороток для ИФА и РСК

Для гипериммунизации морских свинок использовали антигены из штаммов О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014 ВЯ типа О, репродуцированного в монослойной КК ПСГК-30. Вируссодержащую суспензию концентрировали в 100 раз добавлением ПЭГ 8% м.м. 6000, очищали от балластных примесей добавлением трихлорметана 10%. Очищенный вирус инактивировали АЭЭИ в концентрации 0,05% при значении рН 7,2 - 7,8. Животных иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом 21 сут. Антиген с концентрацией белка 15–20 мкг на морскую свинку

вводили в объеме 0,5 см³. Для первой иммунизации использовали эмульсию антигена в равных количествах с полным адьювантом Фрейнда, для второй – с неполным адьювантом Фрейнда. Животных обескровливали через 10 сут после второй иммунизации.

Данным способом были приготовлены по одной серии гипериммунной сыворотки штаммов ВЯ О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014. Полученная гипериммунная сыворотка против штамма ВЯ О №2212/Приморский/2014 проявляла активность в РСК с гомологичным антигеном и гетерологичным антигеном О №1734/Приморский/2000 в разведении 1:20, с другими гетерологичными антигенами типа О активность гипериммунной сыворотки составила 1:6, а полученная гипериммунная противоящурная сыворотка О №2271/Корея/2014 проявляла активность в ИФА с гомологичным антигеном 1:512, с гетерологичным антигеном типа О активность гипериммунной сыворотки составила 1:256.

2.3.9 Получение диагностических антигенов для ИФА и РСК

Для получения антигена для серологических реакций использовали штаммы О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014 ВЯ, адаптированные к культуре клеток перевиваемых линий ПСГК-30 и IB-RS-2. Полученную вирусодержащую суспензию концентрировали в 100 раз добавлением ПЭГ 8% м.м. 6000. Концентрат антигена инактивировали АЭЭИ в концентрации 0,05% при значении рН 7,2–7,8, фасовали во флаконы и высушивали методом сублимации под вакуумом. Указанным способом были приготовлены по одной серии диагностических антигенов, характеристики которых приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика диагностических антигенов из штаммов ВЯ О №2212/Приморский/2014 и О №2271/Корея/2014, полученных в культуре клеток IB-RS-2

Серия	Объем (см ³)	Активность в РСК №2212/Приморский/2014	
		В гомологичной тест-системе	В гетерологичной тест-системе О №1734/Приморский/2000
1	60	1:6	1:4
		Активность в ИФА О №2271/Корея/2014	
		В гомологичной тест-системе	В гетерологичной тест-системе О/PanAsia2
		1:256	1:64

Результаты исследований, приведенные в таблице 4, свидетельствуют о том, что полученные культуральные антигены проявляли более высокую активность в РСК и ИФА в гомологичной тест-системе, чем в гетерологичной.

2.3.10 Совершенствование методов получения диагностических компонентов на основе производственных штаммов и эпизоотических изолятов ВЯ

Были приготовлены 3 препарата 146S-компонента ВЯ на основе штаммов А₂₂/Ирак/64, О № PanAsia2, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011, а также две экспериментальные серии антигенов ВЯ О №2271/Корея/2014 и О №2212/Приморский/2014, полученные на монослойной перевиваемой КК IB-RS-2. Полученные антигены ВЯ хранили с добавлением в качестве стабилизатора сахарозы в объеме 5% от общей массы при температуре 4±2°C до дальнейшего использования.

Исследование активности стабилизированных антигенов проводили на 30, 90, 120 и 180 сутки хранения при температуре 4±2°C. В качестве контрольных образцов использовали нативные антигены на основе гомологичных изолятов без добавления сахарозы, которые хранили при тех же температурных условиях. Исследование активности образцов в сИФА представлены в таблице 5.

Данные, приведенные в таблице 5, свидетельствуют о том, что образцы, стабилизированные 5% сахарозой, обладают значительно большей устойчивостью к воздействию температуры 4±2°C на протяжении 180 сут.

Таблица 5 – Активность антигенов ВЯ в ИФА, стабилизированных 5% сахарозой

Исследуемые антигены	Активность в ИФА после хранения при температуре 4±2°C				
	1 сут	30 сут	90 сут	120 сут	180 сут
Антиген А ₂₂ /Ирак/64 (контрольный)	1:1024	1:512	1:512	1:128	<1:16
Антиген А ₂₂ /Ирак/64 (стабилизированный)	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512
Антиген О/PanAsia2 (контрольный)	1:1024	1:512	1:512	1:64	<1:16
Антиген О/PanAsia2 (стабилизированный)	1:1024	1:1024	1:1024	1:512	1:1024
Антиген Азия-1 №2145 Таджикистан/2011 (контрольный)	1:2048	1:1024	1:512	1:512	1:256
Антиген Азия-1 №2145 Таджикистан/2011 (стабилизированный)	1:2048	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024

Контрольный образец антигена ВЯ штамма Азия-1 №2145 Таджикистан/2011 без стабилизатора в результате длительного хранения в течение 180 сут (срок наблюдения) снизил активность в 8 раз. Контрольные антигены, полученные из ВЯ штаммов А₂₂/Ирак/64 и О/PanAsia2, в течение 180 сут были разрушены полностью и не проявляли активности в ИФА.

Использование в качестве стабилизатора полученных полуфабрикатов антигенов 5% раствора сахарозы, позволило увеличить сроки хранения препаратов антигена при температуре 4±2°C до 180 сут.

Для получения 146S-компонента, концентрированные в 100–150 раз образцы, очищали методом ультрацентрифугирования в течение 4 ч при 110000g. Белковая

полоса, содержащая 146S-антиген, располагалась между 30 и 40% слоями сахарозы и выделялась опалесценцией.

Определение активности и специфичности полученных антигенов осуществляли в двойном сэндвич-варианте ИФА (сИФА). Активность исследуемых антигенов ВЯ в отношении гомологичных сывороток проявлялась в разведении не менее, чем 1:512, активность в отношении гетерологичных сывороток не превышала 1:64. Препараты 146S-антигена были использованы для получения штаммоспецифической сыворотки крови кроликов и морских свинок.

Полученные гипериммунные сыворотки крови морских свинок и кроликов исследовали на активность в сИФА.

Результаты сИФА по определению активности исследуемых антигенов и сывороток представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Активность и специфичность штаммоспецифических улавливающих и детекторных антител

Антитела улавливающие	Разведение			
	A ₂₂ Ирак/64	O PanAsia2	O №2212 Приморский 2014	Азия-1 №2145 Таджикистан 2011
A ₂₂ /Ирак/64	1:3000	<1:50	<1:50	<1:50
O/PanAsia2	<1:50	1:8000	1:4000	<1:50
O №2212 /Приморский 2014	<1:50	1:6000	1:12000	<1:50
Азия-1 №2145 Таджикистан/2011	<1:50	<1:50	<1:50	1:4000
A ₂₂ /Ирак/64	1:600	<1:50	<1:50	<1:50
O/PanAsia2	<1:50	1:1000	1:600	<1:50
O №2212/Приморский/ 2014	<1:50	1:800	1:1500	<1:50
Азия-1 №2145 Таджикистан/2011	<1:50	<1:50	<1:50	1:800

В таблице 6 показано, что штаммоспецифические улавливающие и детекторные антитела активны в типоспецифичных тест-системах, но наибольшую активность в реакции сИФА образцы сывороток проявляют только при использовании диагностических компонентов, полученных на основе гомологичного изолята. Это обстоятельство имеет значение для повышения чувствительности и объективности диагностических тест-систем.

2.3.11 Сравнительная оценка иммуногенной активности противоящурных вакцин

Иммуногенная активность вакцин на основе адьюванта марки Montanide ISA-206 из штаммов O№2212/Приморский/2014 и O№2271/Корея/2014 была проверена на свиньях массой 35–40 кг. При испытании двух серий вакцин трем группам свиней по

5 голов вводили внутримышечно по $2,0 \text{ см}^3$ цельной вакцины, в разведении 1:5 и 1:25 соответственно. В качестве контроля использовали по два невакцинированных животных. Через 21 сут после вакцинации всем животным вводили 10^4 ИД₅₀/0,2 см³ контрольного ВЯ штаммов О№2212/Приморский/2014 и О№2271/Корея/2014. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Испытание вакцин, инактивированных эмульсионных против ящура типа О штаммов О№2212/Приморский/2014 и О№2271/Корея/2014 на свиньях

Разведения	№ животных	О№2212/ Приморский/2014		О№2271/ Корея/2014	
		Титры антител в РН log ₂	Результаты контрольного заражения	Титры антител log ₂	Результаты контрольного заражения
цельное	1	7,50	–	5,75	–
	2	6,25	–	7,00	–
	3	6,25	–	6,00	–
	4	5,75	–	6,50	–
	5	5,75	–	6,75	–
	М±m	6,30±0,32		6,4±0,23	
1:5	6	4,00	–	5,50	–
	7	5,50	–	5,75	–
	8	6,25	–	4,75	–
	9	6,25	–	4,50	–
	10	5,00	–	5,50	–
	М±m	5,4±0,42		5,2±0,24	
1:25	11	4,50	–	4,25	–
	12	5,00	–	3,00	X
	13	4,00	–	4,50	–
	14	3,75	–	4,25	X
	15	4,00	–	4,50	–
	М±m	4,25±0,22		4,10±0,28	
	Контроль1	≤0,50	X	≤0,50	X
	Контроль2	≤0,50	X	≤0,50	X

Примечание: «–» – животные, не проявившие клинических признаков инфекции;
«X» – заболевшие животные.

Из таблицы 7 следует, что свиньи, привитые цельной вакциной из штамма ВЯ О№2212/Приморский/2014, на 21 сут после вакцинации имели титр вируснейтрализующих антител, равный $6,30 \pm 0,32 \log_2$, а свиньи, привитые вакциной в разведениях 1:5 и 1:25 – $5,40 \pm 0,16 \log_2$ и $4,25 \pm 0,22 \log_2$ соответственно. После контрольного заражения заболели с генерализацией процесса только 2 контрольные свиньи.

Свиньи, привитые цельной вакциной из штамма О№2271/Корея/2014, на 21 сут после вакцинации имели титр вируснейтрализующих антител, равный $6,40 \pm 0,23 \log_2$, свиньи, привитые вакциной в разведениях 1:5 и 1:25–

5,20±0,24 log₂ и 4,10±0,28 log₂ соответственно. После контрольного заражения заболели с генерализацией процесса 2 головы, иммунизированные вакциной в разведении 1:25, и 2 контрольные свиньи.

2.3.12 Результаты исследования в РМН сыворотки крови животных, привитых универсальными сорбированными вакцинами из штаммов ВЯ А№2155/Забайкальский/2013 и О№2212/Приморский/2014

В 2016–2019 гг. ФГБУ «ВНИИЗЖ» поставлял универсальные сорбированные вакцины в Республику Корея на основе производственных штаммов ВЯ А№2155/Забайкальский/2013 и О№2212/Приморский/2014. В РМН нами были исследованы сыворотки крови животных после применения бивалентой универсальной сорбированной вакцины при разных способах введения: внутрикожном (ID) в объеме 0,5 см³ и внутримышечном (IM) в объеме 2,0 см³. В таблице 28 показан уровень гуморального иммунитета у животных через 4 и 8 недель после второй вакцинации при постановке РМН с использованием гомологичных вакцинным штаммов А №2155/Забайкальский/2013 и О№2212/Приморский/2014.

Таблица 8 – Уровень гуморального иммунитета у животных, привитых сорбированной универсальной вакциной из штаммов ВЯ А №2155/Забайкальский/2013 и О №2212/Приморский/2014.

Номер пробы	Титр сыворотки в РМН lg			
	А №2155/Забайкальский/2013		О №2212/Приморский/2014	
	4 недели после иммунизации	8 недель после иммунизации	4 недели после иммунизации	8 недель после иммунизации
Универсальная сорбированная вакцина ID				
1.	2,40	2,40	<1,00	1,68
2.	2,40	2,28	<1,00	1,80
3.	2,10	2,40	2,10	2,10
4.	2,40	2,40	1,98	1,50
5.	2,40	2,40	2,40	1,98
6.	2,10	2,40	2,40	2,40
7.	2,28	2,40	2,10	2,40
8.	2,28	2,40	2,10	1,80
9.	1,80	1,80	<1,00	<1,00
Среднее	2,24±0,21	2,32±0,20	1,45±0,18	1,74±0,33
Универсальная сорбированная вакцина IM				
10.	2,40	2,40	2,28	2,40
11.	2,40	2,40	1,80	2,40
12.	2,40	2,40	1,98	2,10
13.	2,40	2,40	1,80	2,28
14.	2,40	2,40	2,40	2,28
Среднее	2,40	2,40	2,05±0,28	2,29±0,13

Примечание: ID - интрадермальный способ введения вакцины

IM - интрамускулярный способ введения вакцины

Данные таблицы 8 свидетельствуют, что универсальная сорбированная вакцина на основе штаммов А №2155/Забайкальский/2013 и О №2212/Приморский/2014 обеспечила высокий уровень иммунитета и его продолжительность у большинства иммунизированных животных через 4 и 8 недель после вакцинации при разных способах введения.

4. Заключение

4.1 Выводы

1. Результаты изучения эпизоотических изолятов вируса ящура, выделенных на территории Дальневосточного федерального округа РФ в 2014–2019 гг., свидетельствуют о заносе в Приморский, Хабаровский и Забайкальский края вируса ящура типа О гомологичных генетических линий, которые были зарегистрированы в соседних неблагополучных по ящуру странах.

2. Изоляты вируса ящура типа О, вызвавшие вспышки ящура в 2014–2015 гг. в Республике Корея, в 2019 г. в Приморском крае РФ, антигенно отличаются от производственных штаммов О/PanAsia2, О №1734/Приморский/2000, О №2102/Забайкальский/2010, О₁/Маниса и О/Тайвань 3/97 и принадлежат к топотипу Юго-Восточная Азия (SEA) генетической линии Муа-98.

3. Изоляты вируса ящура типа О, вызвавшие вспышки ящура в Монголии в 2017 г. и в Забайкальском крае РФ в 2019 г., антигенно отличаются от производственных штаммов О №2212/Приморский/2014 и О/Тайвань 3/97 и принадлежат к топотипу Средний Восток – Южная Азия (ME-SA) генетической линии Ind-2001.

4. Адаптация эпизоотических изолятов, выделенных в Приморском, Забайкальском краях и Монголии в культурах клеток ПСГК-30 и IB-RS-2 позволила получить штаммы вируса ящура со средним титром инфекционной активности $5,81 \pm 0,25 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ и $5,90 \pm 0,25 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$.

5. На основе изученных изолятов вируса ящура О №2271/Корея/2014 и О№2344/Монголия/2017 разработаны и испытаны в комиссионных опытах диагностические средства для лабораторной диагностики ящура.

6. Полученные диагностикумы могут быть использованы для оценки активности противоящурных вакцин, изучения продолжительности иммунитета у вакцинированных животных при разных способах введения и в разные сроки после вакцинации.

4.2 Практические предложения

Внедрены «Методические рекомендации по получению штаммоспецифических гипериммунных сывороток для диагностики ящура в ИФА», утвержденные директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 10.01.2019, на основе которых изготовлены вирусспецифические антительные препараты для серологической диагностики ящура.

На основе изучения эпизоотической ситуации по ящуру в Азиатско-Тихоокеанском регионе и Российской Федерации составлен «Прогноз по

ящуру сельскохозяйственных животных в Российской Федерации на 2018 год» в соавторстве с А.К. Карауловым, В.М. Гуленкиным, Д.А. Лозовым, А.В. Щербаковым, С.Н. Фоминой, В.В. Никифоровым и А.В. Мищенко – Владимир, 2018. – С. 3–55.

Подготовлены производственные штаммы О№2271/Корея/2014 и О№2344/Монголия/2017, депонированные в Коллекции штаммов микроорганизмов (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Подготовленные в результате проведенных исследований антигенных и иммуногенных свойств изолятов вируса ящура типа О производственные штаммы О№2271/Корея/2014 и О№2344/Монголия/2017 могут быть использованы при сравнительном изучении биологических свойств новых изолятов вируса ящура, а также для совершенствования средств диагностики и профилактики ящура.

5. Список опубликованных работ

1. Вспышки ящура на территории Южной Кореи и экономические последствия / **А.А. Фунтиков**, С.Р. Кременчугская // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 1. – С. 30–33.

2. Изучение иммунобиологических свойств изолятов вируса ящура типа О, выделенных на территории Южной Кореи / **А.А. Фунтиков**, С.Р. Кременчугская, Т.К. Майорова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1. – С. 49–54.

3. Изучение иммунобиологических свойств изолята вируса ящура типа А № 2248/G–IV/EGY 18/2012 / **А.А. Фунтиков**, С.Р. Кременчугская, Т.К. Майорова, С.Н. Фомина // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – М., 2018. – Т. 16: 60 лет ФГБУ "ВНИИЗЖ". – С. 182–190.

4. Анализ результатов международных сличительных испытаний ФАО/МЭБ по диагностике ящура и везикулярной болезни свиней / С.Р. Кременчугская, Т.К. Майорова, Е.Н. Калинина, **А.А. Фунтиков** [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – М., 2018. – Т. 16: 60 лет ФГБУ "ВНИИЗЖ". – С. 282–292.

Подписано в печать 06.12.2019 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л. 1.

Тираж 80 экз. Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»