

the high degree of infection by these pathogens was established. It has been shown, that microaerophilic bacteria were found in all species and age groups of monkeys, moreover, the frequency of infection is increasing with age. The ethiological role of *Campylobacter* in development of clinical forms of campylobacteriosis in monkeys are found.

Литература

1. Baze, W.B. *Campylobacter* – induced Fetal Death in a Rhesus Monkey. / W.B. Baze, B.J. Bernacky // *Vet. Pathol. American College of Veterinary Pathologists*. 2002. № 39. С. 605 – 607.
2. Bryant, J.L. *Campylobacter jejuni*, isolated from Patas Monkeys with Diarrhea. / J.L. Bryant, H.F. Stills, R.H. Lentsch, C.C. Middleton // *Lab. Anim. Sci.* 1983. 33 (3). С. 303 – 305.
3. De Mello, M.F. Identification of *Helicobacter* species in gastric mucosa from captive marmosets (*Callithrix* sp.; *Callitrichidae*, primates). / M.F. De Mello, A.B. Monteiro, E.S. Fonseca, A. Pissinatti, A.M. Ferreira // *AmJ. Primatol.* 2005. 66 (2). С. 111-118.
4. Doi, S.Q. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). / S.Q. Doi, T. Kimbason, J. Reindel, A. Dubois // *Vet. Microbiol.* 2005. 108 (1-2). С. 133-139.
5. Fox, J.G. Novel *Helicobacter* species isolated monkeys with chronic idiopathic colitis. // J.G. Fox, L. Handt, S. Xu, Z. Shen, F.E. Dewhirst, B.J. Paster, C.A. Dangler, K. Lodge, S. Motzel, H. Klein. / *J. Med. Microbiol.* 2001. 50. С. 421-429.
6. Mackie, J.T. Gastritis Associated with *Helicobacter*-like Organisms in Baboons. / J.T. Mackie, J. L. O'Rourke. // *Vet. Pathol.* 2003. 40. С. 563-566.
7. Инструкция по применению тест-системы GenePак для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. // М.: «Биоком», 2005. 17с.

УДК: 619:616.98:578.835.2:616-076

**Н.Е. Камалова, Д.Н. Афонина, А.И. Егорова, С.Р. Кременчугская, В.В. Борисов**  
(ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных ФГУ «ВНИИЗЖ»)

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОГО СООТВЕТСТВИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ЯЩУРА С ПОМОЩЬЮ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

**Ключевые слова:** антигенный, эпизоотический, изоляты, штаммы, вирус ящура, иммуноферментный.

**Введение**

Возбудитель ящура обладает значительной антигенной изменчивостью штаммов в пределах одного серотипа, которая выявляется в различные временные промежутки на разных территориях и зависит от видового состава восприимчивого поголовья, его иммунного статуса и множества других факторов. Считается, что основной причиной антигенной изменчивости является изменение аминокислотной последовательности в полипептидах вирусных белков, образующих капсид вириона. Практически такие антигенные изменения могут проявляться как от незначительных отличия между штаммами, которые улавливают только с помощью методов молекулярного анализа, так и в проявлении существенно отличающихся штаммов, которые отличаются и серологически [6]. Причем, по мнению исследователей, при выборе вакцинного штамма изучение антигенного соответствия между штаммами предпочтительнее проводить серологическими методами [10].

Ранее исследователи для изучения это-

го вопроса апробировали серологические методы (РСК, РН, РПГА, РРИД), но все они имеют ряд недостатков: низкая воспроизводимость, чувствительность или специфичность [3, 5, 11]. Реакция нейтрализации (РН) в этом отношении является наиболее объективным методом. Однако существенными недостатками ее являются необходимость условий для работы с вирулентными агентами и длительность получения результатов.

Kitching R.P. и др. (1988) для изучения антигенного соответствия штаммов вируса ящура предложили жидкофазный блокирующий вариант иммуноферментного анализа (ЖФБ ИФА) [8], рекомендуемый в настоящее время Всемирной справочной лабораторией (ВСЛ) по ящуру для идентификации штаммов вируса ящура [9].

Целью нашей работы являлось изучение антигенного соответствия производственных штаммов вируса ящура эпизоотическим изолятам, выделенным на территории РФ и в сопредельных государствах с использованием «Набора для определе-

ния противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в иммуноферментном анализе» (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

**Материалы и методы**

**Адаптацию и размножение** вируса ящура проводили с использованием чувствительных культур клеток почки сирийского хомяка (ВНК-21), почка свиньи (IBRS – 2), первично-трипсицизированной свиньи почки (СП) согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002 г.[2].

**Инактивацию** вирусосодержащей суспензии проводили 0,05% раствором аминокэтилэтиленимина, рН 7,6, (0,05% от общего объема суспензии) в течение 18 ч при температуре 26° С.

**Титрование эпизоотического штамма** проводили в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) против сывороток кроликов/морских свинок, полученных на штамм гомологичного серотипа ВЯ (А<sub>22</sub>, №550, А<sub>22</sub> Ирак 24/64, А Иран/97, О<sub>1</sub>, №1618, О<sub>1</sub>, №1734/Приморский/2000). ИФА выполняли согласно инструкции по применению «Набора для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом», утвержденной зам.Руководителя Россельхознадзора 30.06.2006 года.

В качестве **референтных сывороток** использовали пулы от нескольких голов КРС, иммунизированных однократно моновалентными противоящурными вакцинами А<sub>22</sub>, №550, А<sub>22</sub> Ирак 24/64, А Иран/97, О<sub>1</sub>, №1618, О<sub>1</sub>, №1734/Приморский/2000. Кровь для получения референтных сывороток отбирали на 21-30 сутки после вакцинации. Предварительно титр каждой пробы сыворотки крови определяли в ЖФ ИФА с гомологичным штаммом вируса ящура. Сыворотки крови с титром противоящурных антител не ниже 5,5 log<sub>2</sub> объединяли в пулы и титровали повторно. Полученные сыворотки крови хранили замороженными в виде аликвот объемом 1,5–2,0 см<sup>3</sup> в этикетированных пробирках типа эппендорф при температуре минус 20°С.

**Определение антигенного соответствия** эпизоотических и производственных штаммов вируса ящура в ЖФБ ИФА проводили с помощью «Набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в ИФА», разработанного ФГУ «ВНИИЗЖ». Наставление по его применению утверждено Департаментом вете-

ринарии МСХ РФ 3.02.2004 года.

Титр сывороток КРС против полевого вируса сравнивали с титрами сывороток против гомологичного производственного штамма для определения величины r<sub>1</sub>; степени одностороннего родства, подсчитываемой по Бруксби [1, 9]:

$$r_1 = \frac{\text{титр референтной сыворотки эпизоотическим штаммом}}{\text{титр референтной сыворотки производственным (гомолитическим) штаммом}}$$

Полученные показатели в ИФА интерпретировали согласно критериям, установленным в ВСЛ Ferris и Donaldson [7]: r<sub>1</sub>=0,4 – 1,0 – близкое антигенное родство между эпизоотическим и вакцинным штаммами; r<sub>1</sub>=0,2–0,39 – эпизоотический штамм антигенно умеренно родственен вакцинному штамму, это означает, что вакцина из производственного штамма может быть использована, если не будет найдено более родственного штамма и при условии, что животные будут иммунизированы более 1 раза; r<sub>1</sub><0,2 – эпизоотический штамм отдаленно родственен вакцинному штамму, который не приемлем для защиты от заражения полевым вирусом.

**Антигенное родство в РСК (R)** рассчитывали по Архети и Хорсфала (R= 100×√r<sub>1</sub>×r<sub>2</sub>) согласно Бруксби (1).

**Результаты и обсуждение**

Постановку основного опыта ЖФ ИФА проводили не менее трех раз, предпочтительно в разные дни, для исключения погрешностей при постановке реакции.

На первом этапе работы определили активность индивидуальных проб моновалентных сывороток крови вакцинированного КРС против вируса ящура типа А: А<sub>22</sub>, № 550, А Иран/97, А<sub>22</sub> Ирак 24/64 и типа О: О<sub>1</sub>, № 1618, О<sub>1</sub>, №1734/Приморский/2000. Образцы сывороток крови объединили в пулы и титровали повторно в результате чего активность референтной сыворотки штаммов А<sub>22</sub>, № 550 составила 1:90, А Иран/97 – 1:64, А<sub>22</sub> Ирак 24/64 – 1:90, О<sub>1</sub>, № 1618 – 1:180, О<sub>1</sub>, № 1734/Приморский/2000 – 1:360.

Препараты антигена ВЯ титровали в твердофазном «сэндвич»-варианте ИФА. Выбор рабочего разведения антигена определяли по величине оптической плотности ОП. Оптимальными считали значение ОП в пределах 0,300-0,450. Активность препаратов концентрированных антигенов вируса ящура различных штаммов колебалась от 1:150 до 1:800. При использовании в качестве антигенов исходной культуральной инактивированной вирусосодержащей суспензии эпизоотических штаммов, они были активными в разведении 1:6 и 1:10.

В 1998 году при участии ВНИИЗЖ в международной программе буферной зо-

Антигенное соответствие ( $r_1$ ) производственных штаммов и эпизоотических изолятов вируса ящура типа А в ИФА

Штаммы серотипа А	Показатели $r_1$ с сыворотками крови вакцинированного КРС штаммов		
	А <sub>22</sub> №550	А <sub>22</sub> Ирак 24/64	А Иран/97
А <sub>22</sub> №550	1	1	0,25
А <sub>22</sub> Ирак 24/64	0,7	1	0,25
А№1707/Армения/98	0,17	н/и	0,34
А№1721/Грузия/99	0,17	0,17	н/и
А Иран/97	0,17	н/и	1
А Турция/06	0,25	0,3	0,25
А№2045/Киргизия/07	0,25	0,17	0,34

Примечание: н/и – не исследовали

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения в ИФА и РСК антигенного родства производственного штамма А<sub>22</sub>№550 вируса ящура с эпизоотическими штаммами

Сравниваемые штаммы	Показатели			
	ИФА	РСК		
		$r_1$	$r_1$	$r_2$
А№1707/Армения/98	0,17	0,02	0,34	8
А№1721/Грузия/99	0,29	0,1	0,32	18
А Турция/97	н/и	0,02	0,027	7
А Турция/06	0,25	0,025	0,81	13
А№2045/Киргизия/07	0,25	0,02	1,0	14

Примечание: н/и – не исследовали

ны Закавказья по ящуру, в Армении был выделен изолят вируса ящура серотипа А№1707/Армения/98, значительно отличающийся по антигенно-иммуногенным свойствам от производственного штамма А<sub>22</sub>№550 [4].

В связи с этим было изучено антигенное соответствие 7 штаммов типа А: А<sub>22</sub>№550 Азербайджан/64, А<sub>22</sub> Ирак 24/64, А№1707/Армения/98, А№1721/Грузия/99, А Турция/06, А№2045/Киргизия/07, А Иран/97 по отношению к производственному штамму вируса ящура типа А<sub>22</sub>№550, а также к штаммам А<sub>22</sub> Ирак 24/64 и А Иран/97 (табл. 1).

При сравнении штаммов А<sub>22</sub>№550 и А№1707/Армения/98 показатель  $r_1$ , равный 0,17 по результатам ИФА, лежит в диапазоне от 0 до 0,19, указывающем на высоко значимые серологические вариации между сравниваемыми штаммами. Этот факт был подтвержден результатами при изучении двустороннего антигенного родства в РСК между этими штаммами, которое составило 8%. В дальнейшем, для получения более

объективных результатов при проведении диагностических исследований и серомониторинга по ящуру в Закавказье с использованием выделенного штамма были изготовлены вирусоспецифические диагностические препараты антигена и антител.

В 1999 году аналогичная ситуация возникла в Республике Грузия, когда были отмечены очаги заболевания ящуром типа А у крупного рогатого скота, иммунизированного бивалентной вакциной А, О, при изготовлении которой был использован производственный штамм А<sub>22</sub>№550. Из 16 938 голов КРС, привитых в январе 1999 года, заболело в августе того же года 132 головы. В сентябре полевой материал в виде эпителия афт от КРС, полученный из Адигенского района Грузии, поступил в региональную справочную лабораторию МЭБ по ящуру (ФГУ «ВНИИЗЖ») для проведения диагностики и идентификации возбудителя. Нами была проведена работа по идентификации и изучению антигенных и иммуногенных свойств изолята вируса

ящур типа А/Грузия/99.

Изоляты, выделенные в Армении (А№1707/Армения/98), Грузии (А№1721/Грузия/99) и Киргизии (А№2045/Киргизия/07) в период с 1998-2007 гг., по данным ЖФБ ИФА, представленным в табл. 2, антигенно отличаются от А<sub>22</sub>№550 Азербайджан/64 ( $r_1=0,17 - 0,25$ ). В то же время по данным других опытов в ЖФ ИФА А№1707/Армения/98 и А№1721/Грузия/99 близкородственны между собой ( $r_1=0,72$ ). Полученные данные согласуются с результатами РСК.

В результате было установлено, что по антигенному спектру штамм является оригинальным, а в токсонимическом отношении - новым, обозначенным, как штамм ВЯ типа А№1721/Грузия/99, который может быть использован при изготовлении диагностических препаратов для серомониторинговых исследований и в качестве вакцинного штамма для профилактики и защиты сельскохозяйственных животных от ящура в близлежащих регионах.

В другой серии опытов сравнение штаммов А<sub>22</sub>№550 и А Турция/06 с помощью ЖФБ ИФА выявило их антигенное различие. По данным ИФА, представленным в табл. 1 видно, что показатель  $r_1$  равный 0,25 лежит в диапазоне от 0,2 до 0,39, указывающем на то, что эпизоотический штамм А Турция/06 не является близкородственным с производственным штаммом А<sub>22</sub>№550. Однако вакцина из производственного штамма может быть использована, если не будет найдено более родственного штамма при условии, что животные будут иммунизированы более 1 раза.

Наши данные по ЖФБ ИФА согласовались с результатами ВСЛ.

По результатам контрольного заражения КРС, иммунизированного вакцинами из штамма вируса ящура А<sub>22</sub>№550 в удвоенной дозе и двукратно, количество защи-

щенных животных после заражения вирусом ящура серотипа А Турция/06 составило 2 из 5 и 2 из 3 соответственно. Тогда как при иммунизации вакциной из штамма вируса ящура А Турция/06 защищены были все животные в опыте (5 из 5), зараженные гомологичным вирусом. Результаты контрольного заражения и ЖФ ИФА по определению антигенного соответствия между изучаемыми штаммами совпадают. Однако по данным РСК изолят А Турция/06 сильно отличается от производственного штамма вируса ящура А<sub>22</sub>№550 ( $R=13\%$ ). Это обстоятельство указывает, на то, что при изучении антигенного соответствия изолятов вируса ящура производственным штаммам необходимо комплексный подход, при возможности, с использованием нескольких методов.

В 2000 году в России (Приморский край) были отмечены очаги заболевания ящуром свиней, а в странах Закавказья – крупного рогатого скота, иммунизированного бивалентной вакциной против типов А, О, в состав которой входил антиген из производственного штамма О<sub>1</sub>№194. Однако вакцина не обеспечила удовлетворительной защиты иммунизированных животных. Лабораторными исследованиями в ФГУ «ВНИИЗЖ» афтозного материала, выделенного от больных свиней, был выявлен вирус ящура типа О, имеющий антигенные отличия от штаммов О<sub>1</sub>№194 и О<sub>1</sub>№1618 с помощью РСК и ИФА. Это свидетельствовало о несоответствии используемых средств специфической профилактики и диагностики ящура типа О<sub>1</sub>, используемых Россией и странами СНГ, эпизоотическому вирусу, циркулирующему в 2000 году в России (Приморский край) и странах Закавказья (Грузия). В последующем были изучены антигенные свойства эпизоотического штамма О№1734/Приморский/2000 методом РСК и проведены ис-

Таблица 4

Антигенная характеристика полевых изолятов при сравнении с производственными штаммами О<sub>1</sub>№1618 и О№1734/Приморский/2000 в ИФА

Штаммы серотипа О	Показатели $r_1$ с сыворотками крови вакцинированного КРС штаммов	
	О <sub>1</sub> №1618	О№1734/Приморский/2000
О <sub>1</sub> №1618	1	0,5
О <sub>1</sub> №194	1	0,35
О№1734/Приморский/2000	0,18	1
О Тайвань 3/97	0,13	0,06
О№2036/Казахстан/07	0,71	0,25-0,35

следования антигенного родства наиболее актуальных штаммов вируса ящура типа О, выделенных за последние годы.

Данный эпизоотический штамм, выделенный в Приморском крае, относится к так называемому паназиятскому топотипу вируса ящура типа О, который вызвал пандемию вируса в 1999-2000 гг. в большинстве стран Азии, в том числе во Вьетнаме, Китае, Тайване, Корее, Японии, Монголии, Армении, Грузии. Опустошительная эпизоотия ящура в Великобритании в 2001 году также была вызвана паназиятским вирусом.

Небезыносительным было изучение эпизоотических и производственных штаммов серотипа О в сравнении со штаммом О<sub>1</sub>№1734/Приморский/2000, который позже стал производственным для РФ, в ЖФБ ИФА.

По данным ЖФБ ИФА, представленным в табл. 4, изолят вируса ящура О<sub>1</sub>№1734/Приморский/2000 является близкородственным в антигенном отношении к производственному штамму О<sub>1</sub>№1618 ( $r_1=0,5$ ) и менее родственен с другим производственным штаммом О<sub>1</sub>№194 ( $r_1=0,35$ ) при идентификации по сыворотке против штамма О<sub>1</sub>№1734/Приморский/2000. По результатам тестирования в РСК изолят О<sub>1</sub>№1734/Приморский/2000 и производственный штамм О<sub>1</sub>№1618 относятся к одному подтипу – R= 50% гомологии, а с другим производственным штаммом О<sub>1</sub>№194 – к

**РЕЗЮМЕ**

«Набор для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в ИФА» является экспресс-средством для изучения антигенного родства штаммов ВЯ. Установлена согласованность данных, полученных с помощью РСК, и ЖФБ ИФА при изучении антигенного соответствия между штаммами ВЯ.

**SUMMARY**

“The ELISA kit for FMD antibody detection in sera of farm animals” is an express tool for the study of antigenic relatedness of FMDV strains. The consistency of data received in complement-fixation test and liquid phase blocking ELISA was established in the study of antigenic correspondence among FMDV strains.

**Литература**

1. Бурдов, А.Н. Ящур / А.Н. Бурдов, А.И. Дудников, П.В. Малярец. М.: Агропромиздат, 1990. С. 6.
2. Гусев А. А., Захаров В.М., Шажко Ж.А. и др. Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура. Владимир, 2002.
3. Соколов Л.Н., Гусева Е.В., Мищенко В.А. и др. Антигенные свойства эпизоотических штаммов вируса ящура типов А и О // Наук. вист. Нац. аграр. ун-та. Киев, 2001. Вып. 36. С. 53-57.
4. Шажко Ж.А., Михалишин В.В., Захаров В.М. и др. Изучение иммуногенных свойств вируса ящура типа А, выделенного в Армении в 1998 г. // Соврем. аспекты вет. патол. ж-ж: Матер. конф., посвящ. 40-летию ВНИИЗЖ. Владимир, 1998. – С. 38-41.
5. Шажко Ж.А., Фомина Т.А., Маслова Н.С. и др. Некоторые характеристики эпизоотических штаммов вируса ящура изолированных в СССР // Материалы Международной научной конференции: Ящур (к новой стратегии с борьбы ящуром). – Владимир, 1992. Ч. I. С. 82-96.
6. Doel T.R. Foot-and-mouth disease: vaccine strains

разным подтипам R= 40% гомологии (1). Штамм вируса ящура О Тайвань 3/97 имеет значительные антигенные отличия от штамма вируса ящура О №1734/Приморский/2000 ( $r_1=0,06$ ).

Эпизоотический штамм О№2036/Казахстан/07 является близкородственным производственному штамму О<sub>1</sub>№1618 ( $r_1=0,5-0,71$ ) и является родственным к другому производственному штамму О№1734/Приморский/2000 ( $r_1=0,25 - 0,35$ ). Однако вакцина из штамма О№1734/Приморский/2000 может быть использована только в том случае, если не будет найдено более родственного штамма при условии, что животные будут иммунизированы более 1 раза.

**Выводы**

Показана принципиальная возможность использования разработанного ФГУ «ВНИИЗЖ» «Набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в ИФА» при определении антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура, что позволило существенно сократить сроки получения результатов по сравнению с исследованиями с помощью РН и РСК.

Установлена согласованность данных, полученных с помощью РСК и ЖФБ ИФА при изучении антигенного соответствия между штаммами ВЯ

- and field isolates// Foot-and-mouth disease: control strategies. Lyons, 2-5 June 2002. P. 287-296.
7. Ferris N.P. Donaldson A1 /The World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958-1991) // Rev. Sci. Tech Off Int. Epiz. 1992; 11. – P.657-684.
8. Kitching R.P. A recent history of foot-and-mouth disease // J.Comp. Path. 1998. V. 118. P. 89-108.
9. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th.ed. – Paris, 2008. – Vol. 1. – P. 111-128.
10. Rweyemamu M.M., Pay T.W.F. Serological differentiation of foot-and-mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine viruses. In: Mackowiak C., Regamey R.H., Eds. International Symposium on Foot-and-Mouth Disease. Lyons, 1976. Dev. Biol. Stand. 1977; 35. – P. 205-14.
11. Rweyemamu M.M. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction.// J. Biol. Stand., 1984; 12 (3). P. 323-37.