

- штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенирования гена VP₁ // Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом ПЦР Владимир, 1998. С. 31–41.
5. Сост. А.А. Гусев, В.М. Захаров, Ж.А. Шажко и др. Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура. Утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ. М., 2002. 31 с.
 6. Fomina T.A., Zakharov V.M., Gusev A.A. [e.a.] / Results of seromonitoring in FMD buffer zone in the CIS countries // Europ. Commis. Control FMD: Rep. Sess. Res. Group Stand. Techn. Comm. Boro-
 - vets, Bulgaria, 2000. Rome, 2000. P. 126–130.
 7. Hamblin C., Barnet I.T.R. & Crowther J.R. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA // Immunol. Methods 1986. V. 93. P. 115–121.
 8. Hedger R.S. Foot-and-mouth disease Ames, Iowa, 1981. P. 87–96.
 9. Kitching R.P., Rendle R., Ferris N.P. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus // Vaccine. 1988. V. 6, № 5. P. 403–408.
 10. OIE Disease Information. V. 13–18, №№ 1–52.

УДК 619:578.835.2:616-076

М.В. Жильцова

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА АЗИЯ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК В 2005–2006 гг.

Введение

Возникновение в России ящура экзотического типа Азия-1 обусловило необходимость проведения исследования изолятов, отобранных во время этих вспышек [1, 2]. До этого очаги ящура типа Азия-1 регистрировались с марта 2005 г. сначала в Гонконге, а затем и на территории континентального Китая.

В июне 2005 г. заболевание, вызванное вирусом ящура типа Азия-1, возникло среди КРС частного сектора пограничного с Китаем села Буссе Свободненского района Амурской области. В августе 2005 г. ящур типа Азия-1 был зарегистрирован в Монголии в аймаке Дорнод, граничащем с Китаем [2, 7, 8, 9]. В то же время были установлены вспышки ящура, вызванные вирусом того же типа в Приморском и Хабаровском краях. В начале 2006 г. по одному очагу было зарегистрировано на границе с Китаем в Читинской и Амурской областях. [1, 2].

Материалы и методы

Для изучения репродукции выделенных изолятов вируса ящура Азия-1 № 1987 «Амурский», Азия-1 № 1991 «Монгольский», Азия-1 № 1994 «Приморский», Азия-1 № 2002 «Читинский» были использованы перевиваемые культуры клеток (КК) различного происхождения — СПЭВ (свиная почка), ПСГК-30 (почка сибирского горного козерога), ИВ-RS-2 (почка поросенка); КСТ (коронарные сосуды теленка), ПТ (почка теленка), Ch-91 (гонады козы);

RSK (кожа кролика) и ВНК-21 (почка сирийского хомячка).

Изоляты репродуцировали в пластиковых культуральных матрасах объемом 50 см³. Для культивирования вируса использовали питательные среды Игла, 0,5% ГЛА (гидролизат лактальбумина) на растворе Хенкса, ПСС (питательная среда синтетическая) и ПСП (питательная среда полусинтетическая). Во флаконы со сформированным монослоем вносили свежую порцию поддерживающей среды без сыворотки и 10% афтозную вирусную суспензию в объеме 0,5 см³. Вирус культивировали при 37° С до появления признаков цитопатического действия (ЦПД). Проводили до 6 пассажей. При отсутствии ЦПД в течение 72–96 часов делали «слепые» пассажи. Адаптированным считали вирус, вызывающий 90–100% ЦПД в течение 18–24 часов.

Адаптированные материалы вируса ящура титровали с использованием первично-трипсинизированной культуры клеток СП (почка поросенка). Титр вируса выражали в IgТЦД₅₀/мл и рассчитывали по Риду и Менчу [4, 6].

Специфический антиген вируса ящура выявляли в непрямом двойном сэндвич-варианте иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностического набора, выпускаемого ФГУ «ВНИИЗЖ», согласно «Временному наставлению по выявлению антигена вируса ящура в пробах материала иммунофермен-

тным анализом», утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 22.04.02 г.

На наличие типоспецифических анти-тел к вирусу ящура исследовали сыворотки крови сельскохозяйственных животных и суспензии патологического материала в жидкофазном блокирующем сэндвич-варианте ИФА с использованием «Набора для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в иммуноферментном анализе», согласно «Наставлению по применению набора...», утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 03.02.04 г., а также в реакции микронейтрализации (РН) с использованием КК ИВ-RS-2.

Антитела к неструктурным белкам вируса ящура выявляли с помощью трепинг-ИФА с наборами производства *Womeli Diagnostics* (Швейцария), а также с рекомбинантным белком 3А, любезно предоставленным заведующим лабораторией ФГУ «ВНИИЗЖ» Щербаковым А.В.

Результаты исследований

В июне 2005 г. при исследовании в ФГУ «ВНИИЗЖ» патматериала, поступившего от КРС села Буссе, в пробах афтозного эпителия в РСК и ИФА был обнаружен антиген вируса ящура типа Азия-1, а в полимеразной цепной реакции (ПЦР) также

его геном.

В августе 2005 г. в ФГУ «ВНИИЗЖ» поступили пробы афтозного эпителия от клинически больного КРС из аймака Дорнод Монголии. Методами ИФА, РСК, ПЦР и вирусовыделения с использованием КК в нем также был установлен вирус ящура типа Азия-1. Кроме того, в 6 из 10 проб сывороток крови невакцинированного против ящура типа Азия-1 КРС, отобранных во время вспышки ящура в Монголии, в ИФА были выявлены антитела к вирусу ящура Азия-1, а в пробах от двух животных – постинфекционные антитела к неструктурно-му полипептиду 3А.

При исследовании 7 проб сывороток крови от крупного рогатого скота частного сектора села Видное Вяземского района Хабаровского края с помощью иммуноферментного анализа были обнаружены антитела к вирусу ящура типа Азия-1, а также антитела к неструктурным белкам вируса ящура, что свидетельствовало о переболевании этих животных ящуром типа Азия-1.

При возникновении последующих очагов ящура от животных отбиралась необходимая патологические материалы, которые доставлялись в ФГУ «ВНИИЗЖ» для исследования (табл. 1).

Таблица 1

Результаты лабораторного исследования патологических материалов, поступивших из эпизоотических очагов во время вспышек ящура типа Азия-1 в 2005–2006 гг.

Дата поступления патматериала для экспертизы	Вид материала	Место выделения	Методы исследования
12.06.05	Стенки афт КРС	РФ, Амурская обл., Свободненский р-н, с. Буссе	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
21.08.05	Стенки афт с кожи вымени и слизистой оболочки ротовой полости КРС	РФ, Хабаровский край, Бикинский р-н, ГУСП «Лермонтовское», отд. Добролюбово	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
21.08.05	Стенки афт КРС	Монголия, аймак Дорнод	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
28.08.05	Стенки афт КРС	РФ, Хабаровский край, Вяземский р-н, КГУСП «Котиково», отд. Шереметьево	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
28.08.05	Стенки афт КРС	РФ, Хабаровский край, Бикинский р-н, КГУСП «Лончаковское»,	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
28.08.05	Стенки афт КРС	РФ, Приморский край, Спасский р-н, с. Красный Кут	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
17.12.2005	Соскоб с кожи межкопытной щели	РФ, Хабаровский край, Вяземский р-н, КГУСП «Котиково» отд. Котиково	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
18.12.2005	Стенки афт, слюна КРС	РФ, Амурская обл., Михайловский р-н, с. Куприяново	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
17.01.2006	Стенки афт КРС, соскоб с пяточка свиньи	РФ, Читинская обл., Калганский р-н, с. Средняя Борзя	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение
27.02.2006	Стенки афт КРС	РФ, Амурская обл., Тамбовский р-н, с. Куропатино	ИФА, РСК, ПЦР, вирусовыделение

Материал для исследования получали в виде афт, соскобов со слизистой оболочки ротовой полости, кожи межкопытной щели, кожи вымени, афтозной жидкости и сывороток крови. Проводили обнаружение антигена и генома в материале и его типирование в РСК, ИФА и ПЦР, а также вирусыведение с использованием КК. При этом продолжительность лабораторных исследований варьировала в зависимости от качества и состояния доставленного патматериала. При поступлении материала, соответствующего требованиям методических указаний по выделению и идентификации вируса ящура [3, 4], обнаружение и типирование антигена проводили в течение 4–24 часов. В случае доставки материала ненадлежащего качества или в малом количестве сроки лабораторных исследований могли увеличиваться до нескольких дней, а иногда и одной недели, в связи с необходимостью проведения предваритель-

ного вирусыведения на культуре клеток, и только после получения культурального вируса ящура осуществлять типирование с помощью серологических реакций.

В лабораторных условиях проводили также изучение способности к репродукции выделенных изолятов вируса ящура типа Азия-1 в монослойных культурах клеток. Для этого использовали клеточные линии свиного, бычьего, кроличьего, козьего происхождения, а также в КК ВНК-21. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из приведенных в таблице 2 данных, все изучаемые изоляты вируса типа Азия-1 № 1987 «Амурский», Азия-1 № 1991 «Монгольский», Азия-1 № 1994 «Приморский», Азия-1 № 2002 «Читинский» хорошо репродуцировались в культурах клеток различного происхождения. Они вызывали выраженное ЦПД после 3-4 пассажей через 18–24 часа с инфекционным титром в последнем пассаже от 4,0 до 7,5 lg

Таблица 2

Результаты изучения репродукции в различных клеточных линиях изолятов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в 2005–2006 гг.

КК	изоляты	Азия-1 № 1987	Азия-1 № 1991	Азия-1 № 1994	Азия-1 № 2002
		«Амурский»	«Монгольский»	«Приморский»	«Читинский»
ПСКК-30	Кол-во пассажей для адаптации	4	2	2	2
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	7,5	5,0	6,5	4,0
КСТ	Кол-во пассажей для адаптации	3	2	3	2
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	5,5	4,5	5,75	4,0
Ch-91	Кол-во пассажей для адаптации	4	-	3	-
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	5,5	-	6,25	-
СПЭВ	Кол-во пассажей для адаптации	6	2	-	2
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	5,0	5,0	-	-
ПК	Кол-во пассажей для адаптации	-	-	3	-
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	-	-	6,0	-
IB-RS-2	Кол-во пассажей для адаптации	3	4	-	1
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	6,5	4,5	-	4,5
ВНК-21	Кол-во пассажей для адаптации	3	-	2	-
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	5,75	-	4,5	-
RSK	Кол-во пассажей для адаптации	4	-	4	-
	Титр последнего пассажа IgТЦД ₅₀ /мл	5,0	-	7,0	-

ТЦД₅₀/мл. В КК ПСГК-30 вирусные изоляты вызывали 90-100% ЦПД в течение 18–24 часов на 2–4 пассаже, в КК КСТ на 2–3 пассаже наблюдалось 90-100% ЦПД в течение 18–22 часов с инфекционным титром вируса 3 пассажа 4,5–5,75 lg ТЦД₅₀/мл. При изучении репродукции выделенных изолятов в IB-RS-2 наблюдали 100% ЦПД в течение 18–22 часов на 3–4 пассаже с титром инфекционности 4,5–6,5 lg ТЦД₅₀/мл. Кроме того, эпизоотические изоляты хорошо репродуцировались в КК Ch-91, где на 3–4 пассаже титр инфекционности составил 5,5–6,25 lgТЦД₅₀/мл, а также в КК ВНК-21 и RSK, где 100% ЦПД в течение 20–22 часов наблюдали через 2–4 пассажа соответственно.

Полученные данные могут свидетельствовать о близком родстве изолятов, что подтверждается и данными по изучению

филогенетического родства [5].

Закключение

Проведенные исследования показали, что все изученные эпизоотические изоляты вируса ящура, выделенные во время вспышек ящура в 2005–2006 гг. в Сибири и на Дальнем Востоке, относятся к типу Азия-1, являются родственными и хорошо репродуцируются в чувствительных клеточных культурах различного происхождения, применяемых в лабораторных исследованиях. Этот факт дает основание предполагать общее происхождение изолятов вызвавших вспышки. Все изученные изоляты вызывали 100% ЦПД через 2–6 пассажей с инфекционным титром в последнем пассаже от 4,0 до 7,5 lgТЦД₅₀/мл. Наименьшее количество пассажей для получения 100% ЦПД потребовалось при культивировании в КК ПСГК-30 и IB-RS-2.

Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ № 2538 р.

РЕЗЮМЕ

Приведены результаты исследований патматериалов, поступавших из очагов вспышек ящура типа Азия-1 в 2005–2006 гг., по определению специфического антигена вируса ящура, вирусовыделению с использованием клеточных культур, выявлению способности выделенных эпизоотических изолятов возбудителя к репродукции в различных клеточных линиях, используемых в вирусологической работе, а также наличия антител в сыворотках крови.

SUMMARY

In the paper the results of examinations of pathological samples received from FMD type Asia-1 outbreaks during 2005–2006 are shown. The samples were examined for FMD virus specific antigen and for presence of antibodies in blood sera. From the pathological samples the virus was isolated using cell cultures, and the recovered virus isolates were examined for reproducibility in different cell lines used in virology.

Литература

1. К.Н. Груздев, В.М. Захаров, А.М. Рахманов. Противозооотические мероприятия при заносе в Россию в 2005 г ящура экзотического типа Азия-1 // Актуальные пробл. инфекционной патологии и иммунологии животных. Мат. междунар. научно-практ. конф., М, 2005. С. 66–68.
2. В.М. Захаров, Д.Г. Мусиев. Ящур типа Азия-1 в Китае // Ветеринария, 2005, № 9. С. 8–9.
3. А.А. Гусев, В.М. Захаров, Ж.А. Шаажо и др. Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура. Владимир, 2002. С. 31.
4. Т.А. Фомина, Е.В. Гусева. Лабораторная диагностика ящура и других болезней, протекающих с везикулярным синдромом: Обзор лит. ВНИИЗЖ, 1995. 43 с.
5. J.F. Valarcher, N. Ferris, N.J. Knowles et al. Annual OIE/FAO FMD reference laboratory network report // January-November, 2005. 32 p.
6. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 2005. V. 1. P. 111–121.
7. <http://www.oie.int>
8. <http://www.fao.org>
9. <http://www.rian.ru>

УДК 619:616.98:578.835.2:578.74:616-097

С.Н. Фомина

КОМПЛЕКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОГО РОДСТВА ШТАММОВ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА АЗИЯ-1

Введение

В настоящее время ящур остается одной из наиболее опасных болезней животных из-за своей высокой контагиозности, быстрого распространения и восприимчивости

многих видов домашних и диких животных.

Возбудитель ящура — вирус, обладающий высокой антигенной вариабельностью из-за изменения аминокислотной последовательности в полипептидах вирус-