

КРЕМЕНЧУГСКАЯ Светлана Ревдитовна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ
ВИРУСА ЯЩУРА, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПЕРИОД с 1990 по 2014 гг.**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

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

Научный консультант: **Захаров Валерий Михайлович** доктор ветеринарных наук, профессор, эксперт МЭБ по ящуру

Официальные оппоненты: **Гринь Светлана Анатольевна** член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, врио директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»;

Черных Олег Юрьевич доктор ветеринарных наук, профессор, директор ГБУ Краснодарского края «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»;

Мельник Николай Васильевич член-корреспондент РАЕН, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный ветеринарный врач РФ, лауреат премии правительства РФ, президент национальной ассоциации организаций ветеринарно-биологической промышленности «Ветбиопром».

Ведущая организация ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» РАН, г.Москва

Защита диссертации состоится _____ 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, мкр. Юрвец

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир). Полный текст диссертации и автореферата размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан « » _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы

Ящур относится к особо опасным трансграничным высококонтагиозным вирусным заболеваниям сельскохозяйственных и диких парнокопытных, а также мозолоногих животных, может протекать в форме эпизоотий и панзоотий с тяжелыми экономическими и социальными последствиями, в связи с чем подлежит обязательной нотификации в Международной организации здравоохранения животных (МЭБ).

Разрушительные эпизоотии ящура, такие как на Тайване в 1997 г., в Великобритании в 2001 г., в Японии и Республике Корея в 2010 г., нанесли огромный многомиллиардный экономический ущерб [P. C. Yang et al., 1999; Economic evaluation of foot-and-mouth disease: Final Report. – United Kingdom, 2002; Report of the 39th Session of EuFMD – Rome, 2011; N. Muroga et al., 2012].

В 2017 г. официально подтверждено 5 очагов ящура в России, в Китае - 13, в Монголии – 29, в Южной Корее – 8, в Зимбабве – 53. Вспышки ящура также зарегистрированы в Алжире (4), Ботсване (1), Бутане (1), Демократической Республике Конго (4), Замбии (1), Израиле (4), Иордании (4), Колумбии (11), Малави (1), Мозамбике (2), Мьянме (1), Намибии (6), Непале (1), Палестинской АТ (9), Тунисе (2), ЮАР (8).

В первой половине 2018 г. зарегистрировано 5 очагов ящура типа О в России; 6 – типа О и 1 – типа А в Китае; в Монголии – 22 очага типа О; в Южной Корее – 2 очага типа А; в Замбии – 2, в Израиле – 5, в Кении – 3 очага типа О; в Зимбабве – 60 очагов типа SAT-1.

Россия, Монголия и страны СНГ не являются эндемичными по ящуру, однако существует постоянная опасность заноса болезни из других государств. Зарегистрированные в России и сопредельных государствах в последнее 30-летие вспышки ящура типов А, О, Азия-1 были вызваны вирусом разных топотипов и генетических линий и, по данным многих исследователей, обусловлены антигенно и генетически измененными штаммами вируса. Появление новых генетических линий, ранее никогда не зарегистрированных в России и на постсоветском пространстве, свидетельствует об интенсивной эволюции вируса ящура (ВЯ) в природе [А.В. Щербаков и др., 2006 и 2014; А.М. Тимина и др., 2017; А.Я. Самуйленко и др., 2017, N.J. Knowles et al., 2000].

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир), как Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья (с 1995 г.) и Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии (с 2013 г.), входит в состав сети референтных лабораторий МЭБ/ФАО по ящуру. Основной целью функционирования сети является изучение глобального распространения ВЯ и использование этих данных для информирования МЭБ, ФАО, производителей

противоящурных вакцин, а также гармонизация методов и повышение качества исследований, проводимых международными и национальными лабораториями.

Это диктует необходимость проведения систематических мониторинговых исследований, а при подозрении на ящур незамедлительного отбора проб патологического материала, типирования вируса, изучение антигенного и генетического соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам и, при необходимости, подготовку новых производственных штаммов для изготовления актуальных диагностических и вакцинных препаратов.

1.2 Степень разработанности проблемы. В настоящее время разработаны чувствительные и специфичные методы лабораторной диагностики ящура, подобраны культуры клеток (КК), позволяющие выделять и реплицировать вирус. Отработана схема проведения диагностических исследований с использованием комплекса методов (РСК, ИФА, ОТ-ПЦР). Для штаммовой дифференциации ВЯ широко применяются методы изучения антигенного (*in vitro* и *in vivo*) и генетического соответствия изолятов производственным штаммам, используемым для получения диагностических и вакцинных препаратов. Одним из недостатков РСК, используемой для определения двухстороннего антигенного родства штаммов ВЯ, является длительный период получения штаммоспецифической гипериммунной сыворотки против полевого изолята. Поэтому представляется актуальным разработка рекомендованных МЭБ методов – реакции микронейтрализации (РМН) и ИФА для определения антигенного соответствия полевого изолята и производственного штамма и унификация схемы штаммовой дифференциации изолятов ВЯ.

1.3 Цель и задачи исследования. Целью исследований являлось изучение свойств изолятов ВЯ при возникновении очагов болезни на территории РФ, сопредельных стран и стран – торговых партнеров с определением их соответствия производственным штаммам и при необходимости выбором новых штаммов для производства более эффективных средств диагностики и вакцинопрофилактики ящура.

Для достижения поставленной цели были намечены следующие задачи:

- осуществить анализ эпизоотической ситуации по ящуру в России и зарубежных странах за период с 1990 по 2014 гг.;
- выделить изоляты ВЯ из проб патологического материала при возникновении ящура в различных регионах Российской Федерации и сопредельных стран;
- изучить адаптационные и репродуктивные свойства изолятов ВЯ на КК;
- изучить патогенность адаптированных к КК изолятов на естественно-восприимчивых животных;
- разработать отвечающие требованиям МЭБ методы определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов ВЯ и производственных штаммов в РМН и ИФА;

- провести изучение антигенных свойств изолятов в сравнении с имеющимися производственными штаммами ВЯ серологическими методами и на естественно-восприимчивых животных;
- отобрать, паспортизировать и депонировать оригинальные штаммы ВЯ в Коллекции штаммов микроорганизмов;
- разработать диагностические препараты на основе депонированных штаммов;
- изучить иммуногенные свойства выделенных штаммов в составе инактивированных вакцин серологическими методами;
- рекомендовать новые штаммы вируса для использования при производстве средств диагностики и вакцинопрофилактики ящура.

1.4 Научная новизна исследования состоит в том, что:

- изоляты ВЯ, выделенные в период с 2000 по 2014 г., по антигенным и иммуногенным свойствам отличаются от ранее используемых производственных штаммов и в связи с этим по своей актуальности отобраны для получения диагностических и вакцинных препаратов;
- штаммы ВЯ Азия-1 №1987/Амурский/2005, А №2045/Киргизия/2007, О №2102/Забайкальский/2010, О №2108/Забайкальский/2010, А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013, А №2187/Кути/2013, А №2171/Кабардино-Балкарский/2013, О №2212/Приморский/2014 изучены, паспортизированы, депонированы во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и защищены патентами на изобретения;
- штаммы ВЯ О №1964/Монголия/2004 (13.05.2004), О №2101/Казахстан/2010 (07.02.2012), О №2147/Приморский/2012 (04.02.2013), О №2123/Южная Осетия/2011 (25.04.2013), А №2177/Амурский/2013 (04.09.2014), Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 (15.09.2014) депонированы во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГБУ «ВНИИЗЖ»);
- штаммы ВЯ О №2047/Саудовская Аравия/2008, Азия-1 №2109/Пакистан/2009, А №2029/ Турция/2006 паспортизированы;
- выявлены особенности репродукции в различных клеточных линиях эпизоотических изолятов ВЯ типов А, О и Азия-1, отобранных в различных регионах с 1990 по 2014 г.;
- определены различия в чувствительности естественно-восприимчивых животных к заражению изолятами ВЯ типов А, О, и Азия-1 после их адаптации к культурам клеток;
- установлена согласованность данных, полученных с помощью РСК и РМН при изучении антигенного родства штаммов ВЯ;
- разработана и унифицирована согласно рекомендациям МЭБ и ФАО новая схема штаммовой дифференциации с использованием для изучения антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственным штаммом ВЯ перекрестной реакции микронеutralизации;

– определена степень двустороннего антигенного родства в РСК производственных штаммов и эпизоотических изолятов ВЯ типов А, О и Азия-1, выделенных в различных регионах с 2000 по 2007 г.;

– выявлены иммуногенные свойства штаммов ВЯ в составе инактивированных вакцин серологическими методами в сравнении с результатами контрольного заражения.

Научная новизна полученных результатов подтверждена 9 патентами РФ на изобретения (№№2348690, 2451745, 2553219, 2560268, 2563522, 2575801, 2603255, 2604200, 2650768).

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что создана современная схема штаммовой дифференциации ВЯ с использованием отвечающей требованиям МЭБ перекрестной реакции микронеutralизации для определения антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами, на основе которой разработан ряд соответствующих нормативных документов:

– «Методические указания по отбору, консервированию и транспортировке проб патологического материала и продуктов убоя для лабораторной диагностики ящура», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 29.09.2005;

– «Методика для определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура с помощью иммуноферментного анализа», одобрена ученым советом и утверждена директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 01.07.2009;

– «Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утверждены Россельхознадзором 13.09.2017;

– «Методические указания по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронеutralизации», утверждены Россельхознадзором 13.09.2017;

– «Промышленный регламент на производство наборов для выявления антигена вируса ящура в иммуноферментном анализе», утвержден ФГБУ «ВНИИЗЖ» 04.02.2013;

– «Промышленный регламент на производство наборов для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе», утвержден ФГБУ «ВНИИЗЖ» 04.02.2013;

– «Промышленный регламент на производство сывороток ящурных типоспецифических для серологических реакций», утвержден ФГБУ «ВНИИЗЖ» 02.06.2016;

– «Промышленный регламент на производство антигенов ящурных типоспецифических для серологических реакций», утвержден ФГБУ «ВНИИЗЖ» 02.06.2016;

– «Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом» СТО 00495527-0203-2013;

– «Набор для определения противоящурных антител в сыворотках крови

животных в иммуноферментном анализе» СТО 00495527-0116-2013.

Разработанные методы и средства прошли комиссионные проверки.

1.6 Методология и методы исследований. В работе использованы вирусологические, серологические и иммунологические методы исследований с использованием КК, лабораторных и естественно-восприимчивых к ящуру животных.

1.7 Основные положения, выносимые на защиту:

– экспериментальные данные по изучению биологических свойств штаммов ВЯ типов А, О, Азия-1, выделенных в России и в зарубежных государствах в период с 1990 по 2014 г.;

– результаты разработки методологии определения антигенного родства между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами ВЯ;

– результаты изучения антигенных свойств изолятов ВЯ типов А, О, Азия-1 в РСК, РМН и ИФА;

– результаты изучения иммуногенных свойств штаммов ВЯ в составе инактивированных вакцин серологическими методами в сравнении с результатами контрольного заражения;

– результаты оценки методов диагностики ящура на основе изученных штаммов в международных сличительных испытаниях 2009–2017 гг.

1.8 Личный вклад соискателя. Диссертация выполнена самостоятельно. ПЦР проводили совместно с к.б.н. А.В. Щербаковым, статистическую обработку результатов – совместно с к.б.н. В.М. Гуленкиным. При проведении отдельных этапов работы практическую помощь оказывали сотрудники референтной лаборатории диагностики ящура, отдела биологического и технологического контроля и коллекции штаммов микроорганизмов и лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ».

1.9 Степень достоверности и апробации результатов. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены на международных заседаниях по проблеме ящура: ежегодных совещаниях сети референтных лабораторий МЭБ по ящуру (Пербрайт, Великобритания, 2010 и 2011 гг.; Херес-де-ла-Фронтера, Испания, 2012 г., Бангкок, Таиланд, 2013 г.), Всемирной конференции ФАО/МЭБ по борьбе с ящуром (Бангкок, Таиланд, 2012 г.), Открытой сессии научно-исследовательской группы постоянного технического комитета Европейской комиссии по контролю ящура Херес-де-ла-Фронтера, Испания, 2012 г.), научно-практической конференции «Достижения и перспективы российской ветеринарной науки», посвященной 55-летию ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, 2013), семинарах «Взаимодействие и сотрудничество между странами Азиатско-Тихоокеанского региона по искоренению высокопатогенного гриппа птиц и ящура», Республика Корея, 2014 и 2015 гг.), опубликованы в материалах международных, всероссийских научных конференций, а также на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ».

1.10 Публикации. По материалам диссертации опубликованы 84 научные работы, в том числе 20 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Получено 9 патентов РФ на изобретения и 1 авторское свидетельство.

1.11 Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 345 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов и практических предложений, содержит 74 таблицы, 11 рисунков и приложения. Список использованной литературы включает 201 источник, из них 62 отечественных и 139 зарубежных. В приложении представлены копии документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

Эпизоотические изоляты ВЯ были выделены в референтной лаборатории диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, направлявшихся из очагов.

Эпизоотические изоляты и производственные штаммы вируса ящура типа А: А Тюменский/1990, А Владимирский/1993, А №1707/Армения/98, А/Таджикистан/03, А № 2029/Турция/06, А № 2042/Армения/06, А № 2045/Киргизия/2007, А №2092/Ливан/09, А Таджикистан/09, А №2119/Киргизия/2011, А №2162/Казахстан/2013, А №2176/Монголия/2013, А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013, А №2187/Кути/2013, А №2171/Кабардино-Балкарский/2013, А №2167/Карачаево-Черкесский/2013, А №2177/Амурский/2013, А Иран 4/05 и А Иран 5/05 получены из Всемирной референтной лаборатории ФАО/МЭБ по ящуру (ВРЛ), Пербрайт, Великобритания; А₅ Вестервальд, А₂₂ №550/Азербайджан/64, А₂₂ Ирак/64, А Иран/97.

Эпизоотические изоляты и производственные штаммы вируса ящура типа О: О №1685/Московский/1995, О №1734/Приморский/2000, О №1736/Грузия (Абхазия)/2000, О №1735/Монголия/2000, О №1759/Монголия/2001, О №1934/Монголия/2002, О №1922/Таджикистан/2001, О №1923/Таджикистан/2002, О/Таджикистан/2003, О № 1972/Амурский/2004, О №1964 Монголия/2004, О №2041/Нагорный Карабах/07, О №2036/Казахстан/2007, О №2047/Саудовская Аравия/08, О №2107/Ливан/2010, О №2101/Казахстан/2010, О №2100/Монголия/2010, О №2111/Монголия/2010, О №2102/Забайкальский/2010, О №2108/Забайкальский/2010, О №2123/Южная Осетия/2011, О №2126/Таджикистан/2011, О №2119/Киргизия/2011, О №2124/Восточный Казахстан/2011, О №2147/Приморский/2012, О №2148/Приморский/2012, О №2212/Приморский/2014; О₁ №194/Волгоградский (выделен в 1957 году), О₁ №1618/Чечено-Ингушский (выделен в 1966 году); О₁ Маниса, О Индия/53/79, О Тайвань 3/97, О Тайвань 1/99, О Вьетнам 21/99 (получены из ВРЛ).

Эпизоотические изоляты и производственные штаммы вируса ящура типа Азия-1: Азия-1 №1733/Армения/2000, Азия-1 №1737/Грузия/2001, Азия-1 №1758/Грузия/2001, Азия-1 №1987/Амурский/2005, Азия-1 №1991/Монголия/2005, Азия-1 №1994/Приморский/2005, Азия-1 №2000/Хабаровский/2005, Азия-1 №2001/Амурский/2005, Азия-1 №2008/Амурский/2006, Азия-1 №2002/Читинский/2006, Азия-1 №2003/Читинский/2006, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011; Азия-1 №48 (выделен в Таджикистане в 1964 г.); Азия-1 Shamir 3/89, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 Пакистан/29/09 (получены из ВРЛ).

ВЯ типа С₁ - производственный штамм №564/Закарпатский/1972;

ВЯ типа SAT-1 - производственный штамм №96;

ВЯ SAT-2 Кения 183/74 – производственный штамм, депонирован 27.05.2002;

ВЯ SAT-3 Веч 1/65 – производственный штамм, депонирован 27.05.2002;

Вирус везикулярной болезни свиней (ВБС) – производственный штамм О-72.

Референтные сыворотки крови получены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» на 21–30 сутки от иммунизированного противоящурными моновалентными инактивированными вакцинами КРС: А₂₂ №550/64, А₂₂ Ирак/64, А Турция/06, А Иран/97, А №2045/Киргизия/07, О₁ Маниса, О₁ №1618, О №1734/Приморский/2000 (О PanAsia), О №2047/Саудовская Аравия/08 (О PanAsia2), О 2102/Забайкальский/2010, О №2147/Приморский/2012 (О PanAsia), Азия-1 Шамир/89, Азия-1/Таджикистан/2011 (Sindh-08); от вакцинированных свиней: О Тайвань 3/97, О №2212/Приморский/2014.

Клеточные культуры Первично трипсинизированная культура клеток почки свињи (КК СП). Перевиваемые линии клеток: ВНК-21/13 – почка сирийского хомячка, IB-RS-2 – почка свињи, ПСГК-30 – почка сибирского горного козерога.

Питательные среды и солевые растворы: Игла, ПСС, ГЛА на растворе Хенкса, солевой раствор Хенкса, 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор версена.

Животные: кролики массой 2–3 кг; морские свинки массой 400–500 г; крупный рогатый скот в возрасте 18–20 месяцев массой 250–300 кг; подсвинки массой 30–40 кг.

2.2 Методы исследований

Подготовка афтозной суспензии: из афтозного материала готовили 10%–е и/или 33%–е суспензии на фосфатном буферном растворе.

Вирусовыделение и репродукцию вируса ящура проводили в первично трипсинизированной и перевиваемых монослойных клеточных культурах СП, ПСГК-30, IB-RS-2 и ВНК-21. Зараженную КК инкубировали при температуре 37°C до проявления полного ЦПД. Адаптированным считали вирус, вызывающий 90-100% ЦПД в течение 18-24 ч. Если в течение 72 ч ЦПД не проявлялось, флаконы с зараженной КК замораживали при температуре минус 20°C и делали

3 «слепых» пассажа.

Заражение лабораторных животных. Клинически здоровых морских свинок массой 400-500 г заражали вирусосодержащей суспензией в плантарную поверхность задних лапок методом туннелирования.

Заражение естественно-восприимчивых животных. Крупный рогатый скот (КРС) и мелкий рогатый скот (МРС) заражали интрадермолингвально, свиней – внутрикожно в венчик копытец. За животными вели ежедневные наблюдения и измерение температуры тела, при этом отмечали сроки появления и «созревания» афт на месте введения вирусной суспензии, а также наступление генерализации инфекционного процесса.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура в КК СП проводили в пенициллиновых флаконах с полностью сформировавшимся монослоем первично трипсинизированной культуры клеток СП. Десятикратные разведения вирусосодержащей суспензии, начиная с наивысшего, вносили по 1,0 мл в 4 повторностях во флаконы с клеточной культурой и инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч. Для контроля оставляли незараженный клеточный монослой со сменой и без смены ростовой среды. Флаконы ежедневно просматривали под световым микроскопом для определения специфического ЦПД вируса. Титр инфекционной активности вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Определение титра инфекционной активности вируса микрометодом в КК IB-RS-2 проводили в культуральных 96-луночных планшетах в объеме 150 мкл на лунку. Четырехкратные разведения вируса переносили, начиная с наивысшего, в культуральный планшет, в лунки которого была внесена среда Игла с антибиотиками по 50 мкл. Затем во все лунки вносили по 50 мкл суспензии перевиваемых клеток IB-RS-2 на ростовой среде с концентрацией $0,8-1,0 \times 10^6$ кл/мл. Планшет закрывали пластиковой крышкой и помещали в CO₂-инкубатор при температуре 37°C и 5% CO₂ для инкубации в течение 48 ч. Учет титрования вируса вели с использованием инвертированного микроскопа. Учитывали количество лунок с характерным ЦПД ВЯ. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/50 мкл.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура на морских свинках. На каждое 10-кратное разведение вируса использовали по 4-5 морских свинок. Вирусную суспензию вводили в объеме 0,1 мл в правую заднюю лапку интраплантарно методом туннелирования. Наблюдение за морскими свинками вели в течение 7 суток, ежедневно отмечая появление афт на всех конечностях. Генерализацией считали наличие афт хотя бы на одной из 3 конечностей, в которые вирус не вводили. Титр вируса выражали в lg ГД₅₀/0,1 мл.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура на КРС по методу Гендерсона. 10–кратные разведения афтозной суспензии вводили 2 головам КРС интрадермолингвально в 4 точки по 0,1 мл. Титр инфекционной активности вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации И. П. Ашмарина и выражали в $\lg \text{ИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Определение титра инфекционной активности вируса ящура на свиньях. В венчик каждого копыльца внутрикожно в 4 точки вводили по 0,1 мл 10–кратных разведений вируса. Учёт результатов титрования осуществляли через 24 ч после заражения по наличию афт на месте введения разведений суспензии. Расчет титра ВЯ проводили по методу Рида и Менча в модификации И. П. Ашмарина и выражали в $\lg \text{ИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Получение гипериммунной сыворотки. Вирусную суспензию, полученную в монослое КК ПСГК-30, концентрировали полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 Д с последующим центрифугированием и очисткой хлороформом. Инактивацию вирусной суспензии проводили аминоэтилэтиленимином. Для гипериммунизации морских свинок использовали культуральный инактивированный антиген ВЯ с активностью в РСК в разведении не ниже 1:64. Животным внутримышечно во внутреннюю поверхность бедра трехкратно вводили антиген вируса ящура смешанный с равным количеством неполного адъюванта Фрейнда. Последующие введения антигена проводили через 21 и 28 суток после первой иммунизации. Морских свинок тотально обескровливали через 10 суток после последнего введения антигена.

Выявление и идентификация антигена. РСК для определения типовой принадлежности ВЯ ставили согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002.

Для тестирования проб в ИФА применяли разработанный в ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Набор для выявления антигена вируса ящура в иммуноферментном анализе» в соответствии с инструкцией по применению. В качестве подтверждающего теста для выявления антигена вируса ящура использовали FMDV antigen detection ELISA kit, IZSLER (Brescia, Italia), для выявления антигена вируса ВБС – улавливающие и конъюгированные с пероксидазой хрена детекторные моноклональные антитела 5B7 (Brescia, Italia).

Выявление антигена ВЯ без определения типовой принадлежности проводили с использованием набора SVANODIP FMDV-Ag Test фирмы Svanova (Швеция).

Определение титра антител. Титры вируснейтрализующих антител в образцах сыворотки крови определяли в РМН в 96-луночных культуральных планшетах в перевиваемой КК IB-RS-2 против 100 ТЦД₅₀ вируса. Использовали штаммы вируса, депонированные в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Титром антител считали конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД₅₀ вируса в 50% лунок.

Для исследования сыворотки крови в ИФА с помощью жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич» – варианта использовали набор для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». За титр антител принимали величину, обратную конечному разведению сыворотки, в котором наблюдался процент ингибирования (PI) не менее 50%.

Титры антител в РМН и ИФА выражали в десятичных логарифмах (lg). Положительными считали пробы от животных с титром антител в сыворотке крови 1,68 lg (разведение 1:48) и выше.

Выявление антител к неструктурным белкам вируса ящура проводили в ИФА совместно с сотрудниками референтной лаборатории по особо опасным болезням.

Определение антигенного родства в РСК. Для постановки РСК по 100%-му гемолизу с перекрестным титрованием штаммоспецифических сывороток с гомологичными и гетерологичными антигенами использовали концентрированные инактивированные антигены, полученные при размножении вируса в культуре клеток IB-RS-2, и гипериммунные сыворотки морских свинок.

Двустороннее антигенное родство (R%) штаммов рассчитывали по формуле Архетти и Хорсфала ($R\% = 100 \times \sqrt{r_1 \times r_2}$), где

$$r_1 = \frac{\text{титр сыворотки 1 с антигеном вируса 2}}{\text{титр сыворотки 1 с антигеном вируса 1}}; r_2 = \frac{\text{титр сыворотки 2 с антигеном вируса 1}}{\text{титр сыворотки 2 с антигеном вируса 2}}$$

Расчет r_1 и r_2 проводили, определяя титр сыворотки, который выражали в \log_2 для последнего разведения с задержкой гемолиза на 4 креста, к которому прибавляли поправочный коэффициент. Полученное значение по таблице переводов \log_2 в степень разведения преобразовывали в разведение сыворотки.

Результаты интерпретировали согласно J. Brooksby [А.Н. Бурдов и др., 1990]. Штаммы, имеющие степень родства (R) 70% и более, относятся к одному антигенному варианту; 32–70% – к разным антигенным вариантам; 10–32% – к сильно отличающимся антигенным вариантам; менее 5% – к разным типам.

Определение антигенного соответствия изолятов вируса ящура производственному штамму в РМН и ИФА. РМН проводили в культуре клеток IB-RS-2. Определяли титры референтной сыворотки КРС, иммунизированной вакциной из производственного штамма, против 100 ТЦД₅₀ гомологичного и гетерологичного вируса и выражали в lg.

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 интерпретировали согласно M. Rweyemamu (1984): $\geq 0,3$ – штаммы антигенно родственны, производственный штамм будет защищать от полевого изолята; $< 0,3$ – штаммы антигенно отличаются, производственный штамм не будет защищать от полевого изолята.

Значение r_1 в ИФА интерпретировали согласно критериям, установленным N. Ferris и A. Donaldson (1992):

0,4–1,0 – близкое антигенное родство между полевым изолятом и производственным штаммом; 0,2–0,39 – полевой изолят антигенно родственен производственному штамму, вакцина из производственного штамма может быть использована, если не будет найдено более родственного штамма и при условии, что животные будут иммунизированы более 1 раза; <0,2 – полевой изолят отличается от производственного штамма, вакцина из которого неприемлема для защиты от заражения полевым вирусом.

Иммуногенную активность (ИмД₅₀/см³) моновалентной противоящурной инактивированной сорбированной вакцины на морских свинках испытывали против гомо- и гетерологичных штаммов согласно СТО 00482915-0002-2005, для чего вакцину применяли в разведениях 1:3, 1:9, 1:27 и 1:81, на каждое разведение вакцины использовали по 8 животных. Через 15 суток привитых и контрольных морских свинок заражали адаптированным к этим животным вирусом ящура, гомо- или гетерологичным вакцинному штамму. Учет результатов заражения проводили по генерализации ящурного процесса.

Для определения иммуногенной активности инактивированной сорбированной вакцины на КРС против производственного и эпизоотического ВЯ трем группам животных подкожно в область средней трети шеи вводили вакцину в объемах 2,0, 0,5 и 0,125 мл соответственно, четвертая группа невакцинированных животных являлась контрольной. Через 21 сутки после вакцинации привитых и контрольных животных делили на две группы и заражали интрадермолингвально в две точки афтозным вирусом ящура эпизоотического или производственного штаммов в дозе 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³. Через 7 суток после заражения животных убивали и проводили патологоанатомический осмотр. Защищенными от ящура считали животных без афтозных поражений на конечностях и губах, первичные афты не учитывали. Протективную дозу (ПД₅₀) в прививочном объеме вакцины вычисляли как отношение прививочного объема к ИмД₅₀.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Microsoft Excel.

2.3 Результаты исследований

2.3.1 Характеристика вспышек ящура в России и соседних странах в 1990–2014 гг.

Ящур типа А был зарегистрирован в Советском районе Тюменской области среди КРС и свиней в 1990 г. и у КРС в с. Спасское Владимирской области в 1993 г.

Ящур типа О был диагностирован на свиноферме племзавода «Петровское» г. Лыткарино Люберецкого района Московской области в 1995 г., на свиноферме «Элитное» ОПХ «Степное» Уссурийского района Приморского края в 2000 г., на

ферме ОАО «ОПХ ВНИИ сои» среди КРС в с. Садовое Тамбовского района Амурской области в 2004 г.

В 2005 г. ситуация по ящуру в России значительно осложнилась в связи с заносом вируса ящура типа Азия-1. В Амурской области, Хабаровском и Приморском краях было отмечено 16 неблагополучных пунктов, в 2006 г. две новые вспышки были выявлены в Амурской и Читинской областях.

В 2007-2009 гг. Россия была свободна от ящура. В 2010 г. две вспышки ящура типа О были зарегистрированы у КРС и свиней в п. Абагайтуй Забайкальского и у КРС с. Макарово Шилкинского района, а в 2011 г. вспышка ящура была зафиксирована в с. Усть-Ималка Ононского района Забайкальского края.

В 2012 г. ящур типа О был диагностирован среди КРС и МРС в с. Усачевка Хорольского района и с. Поспеловка Октябрьского района Приморского края.

В 2013 г. в РФ на территории двух субъектов Дальневосточного и Сибирского федеральных округов и трех – Северного Кавказа, был установлен 21 неблагополучный пункт по ящуру типа А. Вспышки ящура были зарегистрированы в Забайкальском крае (9 очагов) и Амурской области (6 очагов), а также в Карачаево-Черкесской Республике (2 очага), Краснодарском крае (3 очага) и Кабардино-Балкарской Республике (1 очаг).

В 2014 г. 8 вспышек ящура типа О было диагностировано среди свиней в Спасском районе Приморского края.

В данный период времени на территории сопредельных стран вспышки ящура были зарегистрированы в Закавказье: в Республике Армения – типа А в 1998 и 2006 гг., типа Азия-1 – в 2000 г.; в Грузии – типа Азия-1 в 2000-2001 гг.; в Нагорном Карабахе – типа О в 2007 г.; в Южной Осетии – типа О в 2011 г.. В Центральной Азии: в Монголии – типа О с 2000 по 2004 г., и в 2010 г., типа Азия-1 – в 2005 г., типа А – в 2013 г.; в Республике Таджикистан – типа А в 2003 и 2009 гг., типа Азия-1 в 2003 и 2011 гг., типа О – в 2011 г.; в Киргизской Республике – типов О и А в 2007 и 2011 гг., в Республике Казахстан – типа О в 2007, 2010-2012 гг., типа А – в 2013 г.. На Ближнем Востоке: в Турции – типа А в 2006 г., в Ливане – типов А и О в 2009-2010 гг., в Саудовской Аравии – типа О в 2007–2008 гг.

Изоляты из вспышек ящура типа А в Иране в 2005 г. и типа Азия-1 в Пакистане в 2009 г. были получены из ВРЛ.

2.3.2 Лабораторная диагностика, выделение ВЯ и изучение адаптационных и репродуктивных свойств изолятов вируса на КК

Для большинства изучаемых изолятов антиген ВЯ был выявлен и идентифицирован в суспензии афтозного материала с использованием РСК и ИФА. Однако для изолятов А №2042/Армения/06, А №2045/Киргизия/07, А №2092/Ливан/09, О №2107/Ливан/2010, О №2036/Казахстан/2007, О №2124/Казахстан/2011 в пробах патологического материала выявить антиген возбудителя не удалось, и типирование было возможно только после проведения последовательных пассажей в КК.

Изоляты ВЯ типа А были адаптированы к КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 на уровне 2-4 пассажей. При этом титр инфекционной активности вируса, адаптированного к КК СП, варьировал от 3,52 lg ТЦД₅₀/мл для изолята А/Турция/975/06 до 6,5 lg ТЦД₅₀/мл для изолятов А №2042/Армения/06 и А №2045/Киргизия/07. Наиболее высокой инфекционной активностью с титрами 7,0–7,33 lg ТЦД₅₀/мл обладали изоляты А/Иран 4/05, А/Иран 4/05, А №2042/Армения/06, А №2045/Киргизия/07, А №2092/Ливан/09, А №2162/Казахстан/2013, адаптированные к КК ПСГК-30, тогда как изоляты А/Турция/969/06 и А/Таджикистан/03 имели титры 5,23–5,25 lg ТЦД₅₀/мл. После адаптации к КК IB-RS-2 титры изолятов А/Турция/726/06 и А №2162/Казахстан/2013 были 6,52 lg ТЦД₅₀/мл и 6,75 lg ТЦД₅₀/мл соответственно, при этом инфекционная активность изолятов А №2119/Киргизия/2011 и А/Турция/726/06 была ниже, и титры составляли 4,25 и 4,33 lg ТЦД₅₀/мл.

Только после проведения 2–3 последовательных пассажей изолятов А №2042/Армения/06 А №2045/Киргизия/07, А №2092/Ливан/09 в культуре клеток ПСГК-30 был выявлен комплементсвязывающий антиген ВЯ типа А.

Наиболее высокие титры инфекционной активности после проведения пассажей в КК СП 7,0–7,5 lg ТЦД₅₀/мл были установлены для изолятов О №1923/Таджикистан/2002, О №2041/Нагорный Карабах/07, О №2102/Забайкальский/2010 и О №1972/Амурский/2004, в то же время титры изолятов О №1685/Московский/1995, О Таджикистан/1/2003, О №2101/Казахстан/2010 находились в диапазоне 3,75–4,76 lg ТЦД₅₀/мл. Титры инфекционной активности большинства изолятов типа О, адаптированных к КК ПСГК-30, составляли 6,0–7,33 lg ТЦД₅₀/мл, однако два изолята О №2047/Саудовская Аравия/2007 и 2008 имели более низкие титры – 4,66 и 5,66 lg ТЦД₅₀/мл. Титры изолятов О №1734/Приморский/2000, О №1964/Монголия/2004, О №2101/Казахстан/2010, адаптированных к культуре клеток IB-RS-2, составляли 7,0–7,33 lg ТЦД₅₀/мл, тогда как титры изолятов О №2036/Казахстан/07 и О №1972/Амурский/2004 – 5,20–5,23 lg ТЦД₅₀/мл.

Выделить вирус из проб, поступивших в 2011 г. из с. Усть-Ималка Ононского района Забайкальского края, путем проведения последовательных «слепых» пассажей в культурах клеток СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 не удалось, несмотря на то, что в исходном патологическом материале от КРС был выявлен антиген ВЯ с использованием экспресс-теста фирмы Svanova и определена его принадлежность к типу О в РСК и ИФА.

Только после адаптации изолятов О №2107/Ливан/2010, О №2036/Казахстан/2007, О №2124/Казахстан/2011 в культурах клеток ПСГК-30 и IB-RS-2 в культуральной суспензии был установлен антиген ВЯ типа О в РСК и ИФА.

В основном титры инфекционной активности изолятов типа Азия-1, адаптированных к КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2, были выявлены в пределах 5,33–7,33 lg ТЦД₅₀/мл. Наиболее низкой инфекционной активностью обладал изолят ВЯ Азия-1 №1994/Приморский/2005, репродуцированный в КК СП – 5,0 lg ТЦД₅₀/мл и IB-RS-2 – 4,0 lg ТЦД₅₀/мл.

Из представленных результатов по изучению адаптационных свойств ВЯ к КК следует, что большинство изучаемых изолятов были адаптированы к КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 на низком пассажном уровне. Средние арифметические значения титров инфекционной активности ВЯ типа А, репродуцированного в КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 составили $5,23 \pm 0,26 \lg$, $6,36 \pm 0,15 \lg$ и $5,79 \pm 0,17 \lg$ ТЦД₅₀/мл, типа О – $5,98 \pm 0,13 \lg$, $6,63 \pm 0,09$ и $6,2 \pm 0,11 \lg$ ТЦД₅₀/мл соответственно. При этом титры инфекционной активности вируса типов А и О, полученного в КК ПСГК-30, достоверно превышали титры вируса, репродуцированного в СП и IB-RS-2 ($p < 0,05$). Титры инфекционной активности ВЯ типа Азия-1 при размножении в КК СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 достоверно не различались ($p > 0,05$) и составляли $5,98 \pm 0,24 \lg$, $6,48 \pm 0,17 \lg$, $5,9 \pm 0,33 \lg$ ТЦД₅₀/мл. В связи с наивысшей инфекционной активностью вируса, адаптированного к КК ПСГК-30, его использовали для повторной изоляции на естественно-восприимчивых к ящуру животных, а также для получения посевного вируса с целью изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

2.3.3 Чувствительность естественно-восприимчивых животных к изолятам ВЯ

Для повторной изоляции большинства изучаемых изолятов использовался вирус, адаптированный к культуре клеток ПСГК-30 с титром инфекционной активности в культуре клеток СП $5,0-7,25 \lg$ ТЦД₅₀/мл. В основном первичные афты на языке появлялись в первые сутки после введения инфекционного материала КРС, исключение составлял вирус ящура О №2124/Восточный Казахстан/2011, при заражении которым в течение 3 пассажей первичные поражения на языке отсутствовали или появлялись на 2 сутки. Только после проведения четвертого пассажа удалось получить афтозный вирус с языка через 24 ч после заражения. Температура тела у животных в первые сутки после заражения изолятами ВЯ варьировала от $39,6^\circ\text{C}$ до $40,9^\circ\text{C}$.

Генерализацию процесса у КРС при изучении большинства изолятов отмечали на 2–5 сутки. Однако при заражении КРС штаммом А/Турция/06 генерализация на конечностях проявлялась через 24 ч после заражения одновременно с первичными клиническими признаками на месте введения, что свидетельствует о высокой инфекционной активности вируса ($4,75 \lg$ ИД₅₀/0,1 мл и $7,66 \lg$ ТЦД₅₀/мл).

Наиболее высокие титры инфекционной активности афтозного вируса на КРС при титровании по методу Гендерсона ($5,0-5,25 \lg$ ИД₅₀/0,1 мл) имели изоляты ВЯ типа А №2045/Киргизия/2007, А №2187/Кути/2013, типа О №2101/Казахстан/2010, О №2123/Южная Осетия/2011, типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011. При титровании на КРС изолятов вируса типа А Иран 5/05, Азия-1 №2001/Амурский/2005 и Азия-1 №2008/Амурский/2006 титры инфекционной активности были ниже $4,0 \lg$ ИД₅₀/0,1 мл и составляли $3,0-3,75 \lg$ ИД₅₀/0,1 мл. Титры инфекционной активности изолятов ВЯ типа О №1685/Московский/1995, О/Тайвань 3/97, О №1734/Приморский/2000, О №2102/Забайкальский/2010, определенные на

свиньях, варьировали от 5,0 до 7,0 lg ИД₅₀/0,1 мл. Титры афтозного вируса, полученного на КРС и свиньях, в культуре клеток СП составляли 4,0–8,33 lg ТЦД₅₀/мл, 4,76–7,66 lg ТЦД₅₀/мл и 6,23–7,76 lg ТЦД₅₀/мл для типов А, О и Азия-1 соответственно.

Выделить ВЯ из проб патологического материала, поступившего в 2011 г. из п. Усть-Ималка Ононского района Забайкальского края на КРС, также как и на КК, не удалось.

На вскрытии у КРС отмечали эрозии на слизистой оболочке губ, эпителии межкопытной щели, пододерматит с отслоением рогового башмака. У павшего КРС на 8 сутки после заражения вирусом О №2101/Казахстан/2010 регистрировали дряблость сердечной мышцы, инфаркты желудочков и предсердий.

В наших исследованиях изолят ВЯ О №1685/Московский/1995 не вызывал клинических признаков при экспериментальном заражении КРС. Однако свиньи заболевали ящуром как при прямом, так и при контактном заражении через 72 и 120 ч соответственно, титр инфекционной активности афтозного вируса, полученного после контактного заражения, составил 7,0 lg ИД₅₀/мл и 8,33 lg ТЦД₅₀/мл. По данным многих исследователей, тропизм возбудителя к определенному хозяину, в данном случае к свиньям, связан с изменениями в гене 3А и характерен для вируса топотипа САТНАУ [С. S. Donn, A. J. Donaldson, 1997; N. J. Knowles et al., 2001; Т. А. Fomina et al., 2003].

В экспериментах по изучению чувствительности свиней и МРС к ВЯ Азия-1, выделенному от КРС в с. Буссе Амурской области в июне 2005 г., было показано, что овцы и свиньи при экспериментальном заражении переболевают ящуром в генерализованной форме с формированием вируснейтрализующих антител и антител к неструктурным белкам вируса ящура. Результаты проведенных нами исследований согласуются с результатами изучения биологических характеристик ВЯ Азия-1/Китай/2005, проведенными китайскими исследователями. Авторы показали, что вирус Азия-1, ответственный за вспышки ящура в Китае в 2005 г., не ограничен видами хозяев и вызывает проявления клинических признаков болезни не только у КРС и овец, но и у свиней как при прямом, так и при контактном заражении [Q. Zhang, et al., 2008].

2.3.4 Определение антигенных свойств изолятов вируса ящура в сравнении с имеющимися производственными штаммами серологическими методами

До 2006 г. антигенные свойства вновь выделенных изолятов с производственными штаммами и ранее выделенными эпизоотическими изолятами изучали путем определения двухстороннего антигенного родства в реакции связывания комплемента по 100% гемолизу.

В связи с необходимостью стандартизации результатов отбора вакцинных штаммов на международном уровне Paton D. J. с соавт. предложили определять антигенное соответствие между производственным штаммом и эпизоотическим изолятом в реакции нейтрализации и ИФА с использованием сыворотки

вакцинированного КРС [D. J. Paton et al., 2005]. В 2006 г. эти методы вошли в Руководство МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных.

В связи с этим в ФГБУ «ВНИИЗЖ» для дифференциации штаммов были начаты разработки РМН и ИФА С этой целью совместно с сотрудниками лаборатории профилактики ящура были получены сыворотки крови КРС на 21–35 сутки после иммунизации моновалентными вакцинами из производственных штаммов ВЯ типа А₂₂ №550, А₂₂ Ирак 24/64 и эпизоотического изолята А Турция/726/06.

Антигенное соответствие (значение r_1) четырех изолятов вируса ящура типа А Турция/2006 и двух изолятов А Иран/05 проводили РМН в КК IB-RS-2. Сыворотку титровали двукратным шагом, гомо- и гетерологичный вирус использовали в одной дозе – 2,0 lg.

Параллельно разработке РМН проводили оптимизацию жидкофазного блокирующего варианта ИФА для определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура.

В таблице 1 представлены результаты сравнительного изучения антигенного родства изолятов генетической линии А Иран/05, выделенных на территории Ирана и Турции в 2005–2006 гг., и производственных штаммов А₂₂ №550 и А₂₂ Ирак 24/64 с использованием РМН, ИФА, РСК и контрольного заражения вакцинированных животных вирусом ящура А Турция 726/06.

Таблица 1 - Антигенное и иммуногенное родство изолятов и производственных штаммов вируса ящура типа А

Производственные штаммы	Изоляты А Турция/06 и А Иран/05			
	РМН (r_1)	ИФА (r_1)	РСК (R%)	Контрольное заражение
А ₂₂ №550	0,09–0,2	0,25	13	0/5*
А ₂₂ Ирак 24/64	0,49–0,78	0,3	32	2/5
А Турция 726/2006	0,7–1,0	0,9–1,0	70	5/5

Примечание:* – в числителе приведено количество защищенных животных, а в знаменателе — количество животных в опыте.

Из данных таблицы 1 следует, что изоляты А Турция/06 и А Иран/05 по результатам РМН и РСК следует считать антигенно отличающимися от производственного штамма ВЯ А₂₂ №550 Азербайджан/64 ($r_1=0,09-0,2$, R=13%). Следовательно, вакцина, изготовленная из последнего, не будет защищать от эпизоотического вируса, что дополнительно подтверждено в опытах по контрольному заражению КРС. Изоляты в антигенном отношении оказались ближе к производственному штамму А₂₂ Ирак 24/64 ($r_1=0,49-0,78$, R=32%), вакцина из которого в опытах по контрольному заражению изолятом А Турция 726/06 защитила только 2 из 5 иммунизированных животных. Показатели антигенного соответствия, определенные в ИФА, находились в диапазоне 0,2–0,39 и свидетельствовали, что изолят и производственные штаммы А₂₂ не являются близкородственными. Наиболее выраженное антигенное соответствие изоляты типа А демонстрировали со штаммом А Турция 726/06 ($r_1=0,7-1,0$, R=70%),

использованным для приготовления экспериментальной вакцины, при иммунизации которой были защищены все животные в опыте, зараженные гомологичным вирусом.

Таким образом, по результатам разработки РМН и ИФА для определения антигенного соответствия с использованием пулов сыворотки крови КРС, вакцинированного моновалентными вакцинами разных штаммов, доказана возможность выявления изолятов ВЯ, антигенно отличающихся и антигенно родственных производственному штамму.

Полученные результаты послужили основанием для проведения комиссионных испытаний и подготовки «Методических рекомендаций по определению антигенного соответствия между производственными штаммами вируса ящура и эпизоотическими изолятами в реакции микронеutralизации», которые были утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 08.02.2008.

Для оценки диагностической чувствительности и специфичности разработанного метода РМН использовали 14 изолятов ВЯ типа А с известным статусом антигенного родства по отношению к вакцинному штамму А₂₂ Ирак 24/64, предоставленные ВРЛ для проведения сличительных испытаний в 2008-2009 гг. Результаты данного исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты определения диагностической чувствительности и специфичности РМН

Результаты РМН	Изоляты с известным статусом	
	положительные ($r_1 \geq 0,3$) 7	отрицательные ($r_1 < 0,3$) 7
положительные $r_1 \geq 0,3$	истинно положительные 6	ложноположительные 0
отрицательные $r_1 < 0,3$	ложноотрицательные 1	истинно отрицательные 7

Исходя из результатов эксперимента, диагностическая чувствительность РМН для определения антигенного соответствия между производственными штаммами ВЯ и эпизоотическими изолятами составила 85%, диагностическая специфичность – 99,9%.

С целью повышения диагностической чувствительности метода была усовершенствована методология РМН и гармонизирована в соответствии с протоколом ВРЛ. Для этого был использован метод перекрестного титрования сыворотки и гомо- и гетерологичного вируса, т. е. двукратные разведения сыворотки взаимодействовали с пятью рабочими дозами вируса. Титры сыворотки в Ig против 100 ТЦД₅₀ вируса ящура гомологичного и гетерологичного штамма рассчитывали по уравнению линейной регрессии согласно формуле:

$$y = -ax + b, \text{ где } a \text{ и } b \text{ – переменные; } x = 2 (100 \text{ ТЦД}_{50}).$$

С целью оценки диагностической чувствительности и специфичности разработанного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» метода ИФА для определения антигенного соответствия использовали 9 изолятов ВЯ типа А с известным статусом антигенного родства по отношению к вакцинному штамму А₂₂ Ирак 24/64, предоставленные ВРЛ. Из четырех исследованных антигенно родственных штамму А₂₂ Ирак 24/64 изолятов три изолята имели значение $r_1 \geq 0,2$, т. е.

показали истинно положительный результат с использованием разработанного метода. Четыре изолята из пяти исследованных, антигенно отличающихся от штамма А₂₂ Ирак 24/64, показали истинно отрицательный результат – $r_1 < 0,2$. Таким образом, чувствительность метода составила 75%, а специфичность 80%.

На основе проведенных исследований были разработаны «Методические рекомендации по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронеutralизации», утвержденные директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 21.11.2012 г. и «Методические указания по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронеutralизации», утвержденные заместителем руководителя Россельхознадзора 12.09.2017 г., «Методика для определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура с помощью иммуноферментного анализа» была утверждена директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 01.07.2009 г.

В дальнейшем для изучения антигенного соответствия изолятов и производственных штаммов ВЯ ИФА использовали для скрининга, а РМН в качестве подтверждающего теста.

2.3.5 Антигенные свойства изолятов вируса ящура типа А

Изоляты ВЯ типа А 1990 и 1993 гг. при исследовании одностороннего антигенного родства в РСК оказались близкородственными с производственным штаммом А₂₂ №550 Азербайджан/64, значения r_1 составили 0,8 и 1,0 соответственно. В связи с этим дальнейшее изучение их антигенных свойств не проводили.

Результаты изучения антигенного родства ВЯ А №1707/Армения/98, выделенного в 1998 г. в хозяйстве Охчик Амасийского района Армении от КРС, в РСК свидетельствовали о его значительных отличиях от производственных штаммов типа А – А₂₂ №550 и А₅ Вестервальд (R=8%). При сравнении штаммов А₂₂ №550 и А №1707/Армения/98 в ИФА показатель r_1 , равный 0,17 ($r_1 < 0,2$), указывал на значительные серологические различия между сравниваемыми штаммами. По результатам реакции нейтрализации с сыворотками реконвалесцентов КРС, штамм вируса ящура А №1707/Армения/98 отличался от производственного штамма А₂₂ №550 (R=45%) и штамма А Иран/87 (R=48%).

Результаты, полученные в РМН, свидетельствовали, что изолят А Турция 726/2006 отличается от вакцинного штамма А₂₂ №550 (r_1 0,06–0,12), и вакцина из этого штамма не способна защищать животных от циркулирующего вируса. Сравнение в РМН данного изолята и производственного штамма типа А₂₂ Ирак 24/64 выявило их антигенное подобие ($r_1=0,49$).

В связи с выявленными антигенными отличиями от производственного штамма А₂₂ №550 штамм А Турция/06 был паспортизирован и использован при выборе наиболее подходящего вакцинного штамма для борьбы с вновь возникающими изолятами наряду с ранее применяемыми для сравнения

производственными штаммами вируса ящура типа А–А₂₂ № 550/Азербайджан/64, А₂₂ Ирак 24/64, А Иран/97.

В наших исследованиях в РМН (таблица 3) изоляты генетической линии А Иран/05 – А/Армения/06, А/Ливан/09, А/Таджикистан/09 были антигенно родственны штамму А/Турция/06 ($r_1=0,37-0,6$), что согласуется с результатами ИФА ($r_1=0,7$ и $0,35$) для штаммов А/Армения/06 и А/Ливан/09 соответственно. Изученные изоляты отличались от штамма А₂₂ №550 ($r_1=0,17-0,21$), исключение составляли изоляты А/Таджикистан/09 ($r_1=0,42-0,5$), и от штамма А₂₂ Ирак 24/64 ($r_1=0,125-0,25$), за исключением изолята А/Ливан/09 ($r_1=0,38$). Тогда как изолят А/Таджикистан/03 антигенно отличался от штаммов А₂₂ №550, А₂₂ Ирак 24/64 и А/Турция/06, но был антигенно родственен штамму А/Иран/97 ($r_1=0,35$).

Таблица 3 - Определение в РМН антигенного соответствия (r_1) изолятов вируса ящура типа А производственным штаммам

Изолят	Сыворотки к производственным штаммам, r_1			
	А ₂₂ №550/64	А ₂₂ Ирак 24/64	А Турция/06	А Иран/97
А Таджикистан/03	0,19	0,17	0,125	0,35
А Армения/06	0,17	0,25	0,37	–
А Киргизия/07	0,21	0,7	0,5	0,125
А Ливан/09	0,2	0,38	0,4	0,06
А/Таджикистан/09 (1)	0,42	0,18	0,42	0,5
А/Таджикистан/09 (2)	0,5	0,125	0,6	0,35

При изучении в РМН изолята А №2045/Киргизия/07 было установлено, что он антигенно отличается от производственного штамма А₂₂ №550/64 ($r_1=0,21$) и является антигенно родственными штаммам вируса ящура А Турция/06 и А₂₂ Ирак 24/64 ($r_1=0,5$ и $0,7$). Результаты изучения антигенного спектра в РСК также свидетельствовали о том, что изолят А/Киргизия/07 антигенно близкородственен изолятам, относящимся к генетической линии А/Иран/05 ($R=66-68\%$), и антигенно отличается от производственных штаммов вируса ящура типа А₂₂ №550/64 и А/Армения/98 и ($R=14$ и 7%). Антигенное родство изолята А/Киргизия/07 штамму А Турция/06 в ИФА ($r_1=0,35$) подтверждает результаты РМН и РСК.

Таким образом, большинство изолятов типа А 2006–2009 гг., относящихся к генетической линии А Иран/05, антигенно отличаются от производственного штамма А₂₂ №550 и близкородственны штамму А/Турция/06.

В связи с возникновением в РФ в 2013 г. многочисленных вспышек, вызванных ВЯ типа А, возникла незамедлительная необходимость определения антигенных свойств изолятов для выбора вакцинных штаммов, наиболее пригодных для борьбы с заболеванием.

Как следует из результатов, представленных на рисунке 1, вакцинные штаммы А₂₂ №550, А₂₂ Ирак/64, А/Иран/97, А/Киргизия/07 оказались неэффективны для борьбы со вспышками ящура типа А в Сибири и на Дальнем Востоке, а также в Монголии и Восточном Казахстане. Антигенное родство на

уровне пограничных значений r_1 было отмечено со штаммом А/Турция/06 (r_1 0,33–0,38). Изоляты А № 2166/Краснодарский/13, А № 2167/Карачаево-Черкесский/13 и А №2171/Кабардино-Балкарский/2013, обусловленные ВЯ типа А генетической линии Иран/2005 топотипа «Азия» подлинии SIS-10, антигенно отличались от всех используемых нами для сравнения вакцинных штаммов типа А.

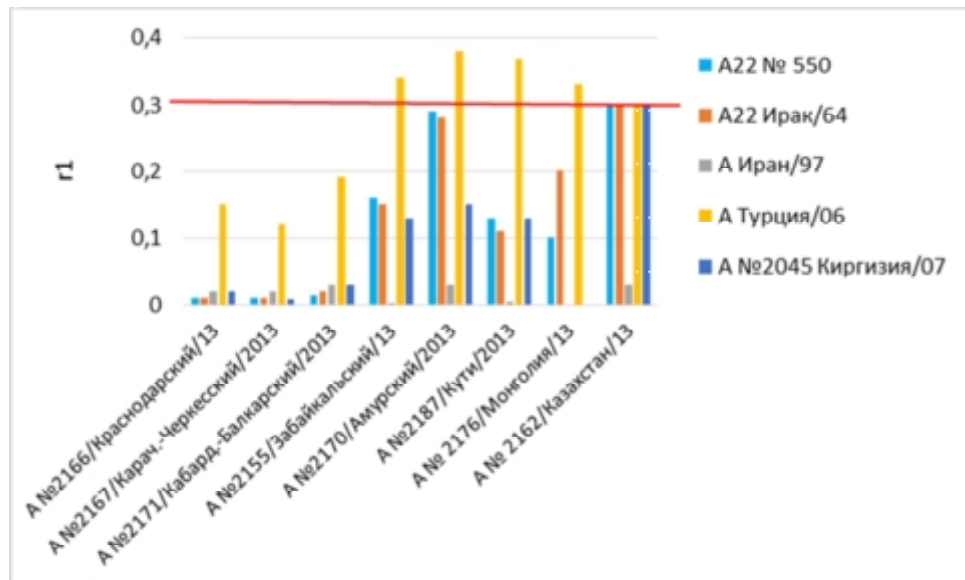


Рисунок 1 – Антигенное соответствие (r_1) изолятов ВЯ типа А 2013 г. производственным штаммам

2.3.6 Антигенные свойства изолятов вируса ящура типа О

Изучение двустороннего антигенного родства в РСК ВЯ О №1734/Приморский/2000, полученного при регистрации в апреле 2000 г. в Приморском крае РФ вспышки ящура типа О среди свиней, с производственными штаммами и некоторыми эпизоотическими изолятами свидетельствует о его отличии от производственных штаммов О₁ №194 и О₁ №1618 (R=40 и 50%), но в то же время близком антигеном родстве со штаммами О Монголия/2000, О Армения/97, О Тайвань/99 и О Вьетнам/99 (R=62–82%).

Изолят О №1964/Монголия/2004, в отличие от О №1734/Приморский/2000, принадлежал к другому топотипу – SEA. По результатам изучения двустороннего антигенного родства в РСК этот изолят не только отличался от производственных штаммов О №194 и О №1618, но и от штамма О №1734/Приморский/2000 (R=11%, 11% и 10% соответственно) и был наиболее антигенно родственен штаммам №№ 1922 и 1923, выделенным в Таджикистане в 2001–2002 гг.

Для изучения иммунологических свойств изолята ВЯ, выделенного в Монголии в 2004 году, было проведено прямое заражение КРС, вакцинированного против ящура О №1734/Приморский/2000. Из 15 голов КРС только у 3 были обнаружены первичные афты на месте введения. Данный факт свидетельствует о том, что не всегда антигенные отличия, даже такие значительные, как в этом случае (R в РСК составляет 10%), приводят к изменению иммунологических свойств. Таким образом, по результатам перекрестного заражения КРС был сделан вывод, что используемая в Монголии

вакцина из штамма О №1734/Приморский/2000 будет эффективной и позволит предупредить дальнейшее распространение заболевания.

Изолят ВЯ типа О №1972/Амурский/2004 по антигенному спектру в РСК также отличался от производственных штаммов О₁ №194 и №1618, антигенное родство с которыми составляло 45 и 40%, но был близок штаммам О №1734/Приморский/2000 (R=74%) и О/Таджикистан/2001 (R=82%).

В связи с выявленными антигенными отличиями штамма О №1734/Приморский/2000 от применяемых до 2000 г. для диагностики и профилактики ящура производственных штаммов, в дальнейших исследованиях штаммовую дифференциацию вновь появляющихся изолятов проводили в РМН с использованием сыворотки крови, полученной от КРС, иммунизированного моновалентной вакциной О №1734/Приморский/2000.

Результаты свидетельствовали, что эпизоотические изоляты новой паназиатской генетической линии О PanAsia2 – О Казахстан/2007, О Киргизия 1/2007, О Киргизия 2/2007, О Нагорный Карабах/2007 являются антигенно родственными производственным штаммам вируса ящура типа О №1734/Приморский/2000, О₁ Маниса и О₁ №1618 ($r_1 \geq 0,3$). Из этого следует, что вакцина из производственного штамма О № 1734/Приморский/2000 будет защищать животных от циркулирующего вируса генетической линии О PanAsia2. Полученные в РМН результаты были подтверждены при изучении в РСК двустороннего антигенного родства ВЯ типа О №2036/Казахстан/07 с производственными штаммами О₁ Маниса, О₁ №1618 и О №1734/Приморский/2000 показатель R% составил 76, 79 и 84% соответственно.

В связи с сообщениями Пербraitского института о том, что вакцина из штамма О₁ Маниса не обеспечивала должной защиты животных в полевых условиях, и полевые изоляты О PanAsia2, циркулировавшие на Среднем Востоке в 2008–2010 гг., имели слабое антигенное соответствие данному штамму в вакцинном матчинге, необходимо было получить новый производственный штамм. С этой целью был изучен и паспортизирован штамм ВЯ О/Саудовская Аравия/08 (О PanAsia2). Из штамма О PanAsia2 была изготовлена моновалентная вакцина для получения референтной сыворотки крови вакцинированного КРС. Штамм О PanAsia2 наряду со штаммами О₁ Маниса и О №1734/Приморский/2000 (О PanAsia) использовали в РМН и ИФА для определения антигенного соответствия новых полевых изолятов вакцинным штаммам.

По результатам изучения антигенного соответствия в РМН, представленным в таблице 4, вакцинные штаммы О₁ Маниса, О PanAsia и О PanAsia2 в антигенном отношении перекрывают изоляты О №2101/Казахстан/2010 и О №2119/Киргизия/2011, относящиеся к топотипу Средний Восток-Южная Азия (ME-SA) сублинии О/PanAsia2. Изоляты О №2107/Ливан/2010 и О №2123/Южная Осетия/2011, принадлежащие к этой же генетической линии, антигенно родственны производственному штамму О PanAsia2 ($r_1=0,34-0,47$), но отличаются от штамма О₁ Маниса ($r_1=0,25-0,28$). Изолят О №2107/Ливан/2010 имеет наиболее близкое антигенное родство с вакцинным штаммом О №1734/Приморский/2000 ($r_1=0,43$).

Таблица 4 - Определение в РМН антигенного соответствия (r_1) изолятов вируса ящура типа О, выделенных в 2010-2014 г., производственным штаммам

Изолят	Сыворотки к производственным штаммам, r_1		
	О ₁ Маниса	О/Приморский/2000	О PanAsia2
О №2101/Казахстан/2010	0,5	0,8	0,74
О №2107/Ливан/2010	0,25	0,43	0,34
О №2123/Южная Осетия/2011	0,28	0,28	0,47
О №2119/Киргизия/2011	0,35	0,76	0,95
О №2102/Забайкальский/2010	0,31	0,36	0,33
О №2108/Забайкальский/2010	0,33	0,62	0,42
О №2100/Монголия/2010	0,4	0,63	0,63
О №2111/Монголия/2010	0,6	0,8	0,39
О №2124/Восточный Казахстан/2011	0,72	0,9	0,93
О № 2147/Приморский/2012	0,85	0,05	0,02
О №2148/Приморский /2012	0,65	0,1	0,05
О №2212/Приморский/2014	0,27	0,08	0,08

Штаммы О₁ Маниса, О/Приморский/2000 и О PanAsia2 в антигенном отношении перекрывают изучаемые изоляты О №2102 Забайкальский/2010, О №2108 Забайкальский/2010, О №2100/Монголия/2010 и О №2111/Монголия/2010, относящиеся к топотипу SEA. Однако изолят О №2108 Забайкальский/2010 в РМН демонстрировал более близкое антигенное родство штаммам О/Приморский/2000 и О PanAsia2 (r_1 составляло 0,62 и 0,42) по сравнению с изолятом О №2102/Забайкальский/2010, имеющим с этими штаммами более низкие значения показателя r_1 (0,36 и 0,33).

Для подтверждения результатов изучения антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов серологическими методами было проведено контрольное заражение 5 голов КРС, иммунизированного сорбированной инактивированной моновалентной вакциной из штамма О PanAsia2 с протективной активностью более 6 ПД₅₀, ВЯ О №2108/Забайкальский/2010. При значении показателей r_1 в РМН и ИФА 0,42 и 0,47 соответственно, гарантирующих защиту от эпизоотического вируса, все 5 голов животных были защищены от генерализованной формы ящура.

Изолят сублинии О PanAsia 2011 г. из Восточного Казахстана показал близкое антигенное родство с вакцинными штаммами О₁ Маниса, О/Приморский/2000 и О PanAsia2, тогда как изоляты О № 2147/Приморский/2012 и О №2148/Приморский/2012, принадлежащие также к той же сублинии, антигенно отличались от штаммов О №1734/Приморский/2000 и О PanAsia2 ($r_1 < 0,3$), но были антигенно родственны штамму О₁ Маниса.

При перекрестном заражении КРС, вакцинированного бивалентной вакциной (А, О PanAsia2), эпизоотическим изолятом ВЯ О № 2147/Приморский/2012 ПД₅₀ по типу О составило 3,48. Титры антител в сыворотке крови вакцинированных животных в РМН были в 2,7–3,0 раз выше на гомологичный вакцинный штамм вируса, чем на вирус О № 2147/Приморский/2012, а значение r_1 составило 0,34, что подтвердило результаты

матчинга в РМН об отсутствии антигенного родства между вакцинным штаммом O PanAsia2 и изолятом O № 2147/Приморский/2012.

Антигенное соответствие (r_1) изолята O №2212/Приморский/2014, вызвавшего вспышку ящура среди поголовья свиней в мае 2014 г. в Спасском районе Приморского края, и штамма O₁ Маниса составило 0,27, O №1734/Приморский/2000 – 0,08, O PanAsia2 – 0,08, O № 2102/Забайкальский/2010 – 0,18 и O № 2147/Приморский/2012 – 0,38, O/Тайвань 3/97 – 0,09. Следовательно, изолят вируса ящура O №2212/Приморский/2014, принадлежащий к топотипу SEA, не имеет антигенного родства в РМН ($r_1 < 0,3$) с производственными штаммами вируса ящура O №1734/Приморский/2000, O ПанАзия2, O №2102/Забайкальский/2010, O Тайвань 3/97, используемыми в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

2.3.7 Антигенные свойства изолятов вируса ящура типа Азия-1

Результаты изучения антигенного родства штамма ВЯ типа Азия-1 №1737/Грузия/2000 в РСК с производственным штаммом Азия-1 №48 и штаммами, выделенными ранее на территории Ирана, Пакистана и других стран, свидетельствуют о том, что данный штамм идентичен штамму Азия-1 Иран 58/99 ($R=77\%$) и отличается от других сравниваемых штаммов типа Азия-1, в том числе от Азия-1 №48 и Азия-1 №1987/Амурский/2005, двустороннее антигенное родство с которыми составляло 32 и 13% соответственно.

При изучении двустороннего антигенного родства в РСК установлено, что эпизоотический изолят ВЯ Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенный от КРС 12 июня 2005 г. в с. Буссе Свободненского района Амурской области, значительно отличается от отечественного производственного Азия-1 №48/Таджикистан/64 и зарубежного вакцинного штамма Азия-1 Shamir 3/89 ($R=26$ и 17% соответственно). Кроме того, он не является антигенно родственным и вакцинному штамму Азия-1 Иран 58/99 ($R=23\%$). Согласно классификации Бруксби штаммы, имеющие степень родства 10–32%, рассчитанную по формуле Архетти и Хорсфала, относятся к сильно отличающимся.

Проведенные нами исследования в РСК показали, что штамм ВЯ типа Азия-1 №1991/Монголия/2005 является антигенно родственным штамму ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 ($R=83\%$), в то же время он антигенно отличается от производственных штаммов типа Азия-1 Shamir 3/89 и Азия-1 №48 (R составляет 35 и 28% соответственно).

С использованием сыворотки крови КРС, полученной через 21 день после иммунизации животных вакциной из штамма вируса ящура типа Азия-1 №48, в РМН было установлено, что антигенное соответствие (r_1) между производственным штаммом и эпизоотическим вирусом Азия-1 №1987/Амурский/2005 составляет не более 0,22, что характерно для значительных антигенных отличий. В РМН с двумя сериями сыворотки крови КРС, вакцинированного моновалентными противоящурными вакцинами Азия-1 Shamir 3/89, было установлено, что r_1 эпизоотического ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 по отношению к производственному штамму Азия-1

Shamir 3/89 составляло 0,25 и 0,18, а эпизоотического ВЯ типа Азия-1 Монголия/2005 – 0,25. Изоляты Азия-1 №2002/Читинский/06, выделенный от больных свиней, Азия-1 №2003/Читинский/06, выделенный от КРС, и Азия-1 №1994/Приморский/05 также не были антигенно родственны штамму Азия-1 Shamir 3/89 ($r_1 < 0,3$). При интерпретации этих данных согласно Paton et al., 2005, следует, что все перечисленные выше эпизоотические изоляты существенно отличаются от производственных штаммов Азия-1 №48 и Азия-1 Shamir 3/89, и вакцины из данных штаммов не способны защищать животных от циркулирующего вируса. Таким образом, проведенные серологические исследования по изучению полевых изолятов ВЯ типа Азия-1, выделенных в 2005 г., свидетельствуют о значительных антигенных отличиях циркулирующего вируса от производственных штаммов этого типа и согласуются с результатами изучения филогенетических характеристик этих штаммов [А. В. Щербаков и др., 2006].

Подтверждение результатов серологических исследований было также получено при перекрестном заражении вакцинированного КРС ВЯ типа Азия-1 производственного и эпизоотического штаммов. Было выявлено, что ПД₅₀ в прививном объеме вакцины против производственного штамма типа Азия-1 №48 составила 10,5, тогда как против эпизоотического изолята Азия-1 №1987/Амурский/2005 – 3,4. Эти данные свидетельствуют о том, что вакцина из производственного штамма оказалась в 3 раза менее иммуногенной по отношению к циркулирующему эпизоотическому вирусу.

Результаты изучения иммунологического родства штаммов, полученные на морских свинках, свидетельствуют, что вакцина из производственного штамма Азия-1 Иран 58/99 была достаточно иммуногенна в отношении различных вакцинных штаммов ВЯ типа Азия-1. Однако ее иммуногенность была в 2,3 раза ниже по отношению к эпизоотическому штамму №1987/Амурский/2005 (ПД₅₀ 46,51 и 20,41 соответственно).

Вакцина из эпизоотического штамма ВЯ типа Азия-1 №1987/Амурский/2005 была в 4,8 раз более иммуногенна против гомологичного вируса (ПД₅₀–42,5), чем против гетерологичных производственных штаммов ВЯ типа Азия-1 Иран/58/99 и Азия-1 №48 (ПД₅₀–8,69).

Штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 16.05.2006 г. депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, защищен патентом № 2348690 и использовался в качестве производственного для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

В связи с выявленными в Пербрайтской лаборатории значительными антигенными отличиями изолятов ВЯ Азия-1 генетической линии Sindh-08 от производственных штаммов, были изучены антигенные характеристики изолятов ВЯ типа Азия-1/Пакистан 29/09 и Азия-1/Таджикистан/2011. Результаты показали, что вакцина из штамма Азия-1/Амурский/2005 не защищает животных от генерализованной формы ящура при контрольном заражении вирусом ящура Азия-1/Пакистан 29/09. Из результатов скрининговых исследований антигенного родства изолятов ВЯ типа Азия-1 в ИФА следует, что ВЯ Азия-1/Пакистан 29/09 антигенно родственен, но не близкородственен, штамму Азия-1 Shamir 3/89, т.к.

значение $r_1=0,25$ лежит в диапазоне 0,20–0,39, что согласуется с результатами ИФА ($r_1=0,22$), полученными в лаборатории Пербрайта [WRLFMD Quarterly Report January-March 2010]. Изолят вируса ящура Азия-1/Таджикистан/2011 отличается от штамма Азия-1 Shamir 3/89 ($r_1=0,13$).

Наши результаты изучения антигенных свойств изолятов ВЯ Азия-1/Пакистан 29/09 и Азия-1/Таджикистан/2011 в РМН свидетельствуют об их значительном отличии от производственного штамма вируса Азия-1 Shamir 3/89 ($r_1=0,14$ и $0,21$), что подтверждает исследования лаборатории Пербрайта об отсутствии вакцинных штаммов, способных сдерживать распространение вируса, относящегося к генетической линии Sindh-08.

2.3.8 Напряженность иммунитета у естественно-восприимчивых животных после иммунизации вакцинами на основе выделенных штаммов вируса ящура

Из штамма ВЯ А №2045/Киргизия/2007 были приготовлены сорбированные и эмульсионные вакцины. Для проведения экспериментов использовали 22 головы КРС, животные были разделены на 4 группы по 5 голов в каждой, 2 головы оставались контрольными.

Титры антител у вакцинированных животных определяли в РМН против гомологичного штамма ВЯ. Контрольное заражение проводили через 91 сутки после вакцинации (СПВ) путем интрадермолингвального введения афтозного ВЯ КРС А Турция/06 в дозе 10^4 ИД₅₀/0,1 мл. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Сравнение титров вируснейтрализующих антител и результатов контрольного заражения КРС, иммунизированного вакцинами из штамма вируса ящура А №2045/Киргизия/2007

Наименование вакцины	Титр вируснейтрализующих антител (lg)		Контрольное заражение 91 СПВ
	21 СПВ	91 СПВ	
Сорбированная	2,26±0,07	1,98±0,19	1/5*
Сорбир.универсальная	2,4±0,09	2,06±0,17	4/5
Эмульсионная ISA 70	2,69±0,25	2,82±0,46	4/5
Эмульсионная ISA 206	1,92±0,24	2,69±0,16	5/5

Примечание:* – в числителе приведено количество защищенных животных, а в знаменателе – количество животных в опыте.

Для испытания культуральных инактивированных моновалентных эмульсионных вакцин из штамма ВЯ типа А №2177/Амурский/2013 были использованы 2 группы по 17 голов взрослого КРС. Каждой подгруппе из 5 животных вводили вакцину в прививных объемах 2,0, 0,5 и 0,125 см³. Контролем служили по 2 невакцинированных животных.

В таблице 6 представлены титры антител в РМН и жидкофазном блокирующем варианте ИФА (ЖФБ-ИФА) на 28 и 70 СПВ в сыворотке крови животных, вакцинированных в прививном объеме 2,0 см³.

Таблица 6 – Титры антител в РМН и ИФА в сыворотке крови КРС, иммунизированного вакцинами из штамма вируса ящура А №2177/Амурский/2013

Наименование вакцины	Титр антител РМН (lg)		Титр антител ЖФБ-ИФА (lg)	
	28 СПВ	70 СПВ	28 СПВ	70 СПВ
Эмульсионная ISA 70	3,15±0,08	2,78±0,18	2,84±0,13	2,81±0,22
Эмульсионная ISA 206	3,22±0,08	2,71±0,19	2,91±0,15	2,81±0,17

Эмульсионные вакцины из штамма ВЯ А №2177/Амурский/2013 с адъювантами Montanide ISA 70 и ISA 206 при однократном введении КРС индуцировали образование антител, регистрируемых в ЖФБ-ИФА и РМН в титрах выше 2,0 lg начиная с 28 суток после вакцинации на протяжении всего срока наблюдения (70 суток после вакцинации). Полученные результаты позволяют предположить, что вакцинированные животные будут защищены от заражения вирусом ящура.

Из штамма ВЯ О №2102/Забайкальский/2010 также были приготовлены сорбированные и эмульсионные вакцины. Для проведения экспериментов использовали 22 головы КРС, животные были разделены на 4 группы по 5 голов в каждой, 2 головы оставались контрольными. Титры антител у вакцинированных животных определяли в РМН и ЖФБ-ИФА. Контрольное заражение проводили через 35 суток после вакцинации путем интрадермолингвального ведения афтозного ВЯ КРС О №2108/Забайкальский/2010 в дозе 10^4 ИД₅₀/0,1 мл.

Представленные в таблице 7 показатели уровня антител у животных, иммунизированных сорбированными и эмульсионными вакцинами О №2102/Забайкальский/2010 в РМН и ИФА, согласуются с результатами контрольного заражения. Следует отметить, что титры антител после применения эмульсионных вакцин в РМН и ИФА превышали 2,0 lg.

Таблица 7 – Сравнение титров антител в РМН и ИФА и результатов контрольного заражения КРС, иммунизированного вакцинами из штамма вируса ящура О №2102/Забайкальский/2010

Наименование вакцины	Титр антител (lg) 35 СПВ		Контрольное заражение 35 СПВ
	РМН	ЖБВ-ИФА	
Сорбированная	2,11±0,26	1,59±0,12	4/5*
Сорбир. универсальная	2,33±0,17	2,01±0,12	5/5
Эмульсионная ISA 70	2,63±0,16	2,14±0,08	5/5
Эмульсионная ISA 206	2,54±0,25	2,17±0,09	5/5

Примечание:* – в числителе приведено количество защищенных животных, а в знаменателе – количество животных в опыте.

В таблице 8 показаны результаты изучения иммунного ответа после иммунизации КРС сорбированной вакциной из штамма ВЯ Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011 при исследовании сывороток крови в РМН и ЖБВ-ИФА.

Контрольное заражение проводили через 21 сутки после вакцинации путем интрадермолингвального ведения гомологичного вируса в дозе $10^{4,0}$ ИД₅₀/0,1 мл.

Результаты, представленные в таблице 8, свидетельствуют, что при средних значениях титров антител в РМН – $2,55 \pm 0,33$ Ig и ИФА – $1,83 \pm 0,09$ Ig от генерализованной формы ящура были защищены все животные в опыте.

Таблица 8 – Сравнение титров антител в РМН и ИФА и результатов контрольного заражения КРС, иммунизированного вакциной из штамма ВЯ Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011

№ животных	Титр антител (lg) 21 СПВ		Контрольное заражение 21 СПВ
	РМН	ЖБВ-ИФА	
1	2,4	1,98	4/4
2	3,31	1,68	
3	3,31	1,98	
4	1,8	1,68	
M±m	$2,55 \pm 0,33$	$1,83 \pm 0,09$	

Примечание:* – в числителе приведено количество защищенных животных, а в знаменателе – количество животных в опыте

2.3.9 Использование диагностических препаратов на основе изученных изолятов в международных сличительных испытаниях

В разные годы в ФГБУ «ВНИИЗЖ» были изготовлены и использовались для диагностики и серомониторинга тест-системы для ИФА на штаммы ВЯ типа О №1734/Приморский/2000, О №2102/Забайкальский/2010, О №2101/Казахстан/2010, О PanAsia2; типа А Турция/06, А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013; типа Азия-1 №1987/Амурский/05, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 и др.

Диагностическая чувствительность методов с использованием изученных изолятов ВЯ по результатам участия ФГБУ «ВНИИЗЖ» как Региональной референтной лаборатории МЭБ по ящуру в ежегодных международных сличительных испытаниях (МСИ) по диагностике ящура и ВБС, организованных ВРЛ ФАО/МЭБ по ящуру и Европейским сообществом референтных лабораторий по ящуру и ВБС в 2009 – 2017 гг., составляла: ИФА для выявления антигена ВЯ— 96%, ИФА для определения антител к ВЯ – 97,4%, РМН – 95%. Диагностическая специфичность всех методов – 100%.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что выделенные на территории России в период с 1990 по 2014 г. штаммы вируса ящура типов А, О и Азия-1 в основном были антигенно близкородственны изолятам вируса, циркулировавшим в сопредельных странах, что свидетельствует о заносном характере вспышек ящура в Российской Федерации. Разработанные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в ходе исследований средства и методы диагностики с использованием депонированных и защищенных патентами РФ штаммов вируса ящура по результатам международных сличительных испытаний проявили высокую чувствительность и специфичность, позволили выявлять антигены и антитела гетерологичных штаммов в шифрованных образцах, показали высокую эффективность при

диагностических исследованиях, проводимых при возникновении вспышек ящура в стране.

3.1 Итоги выполненного исследования

1. Разработана в соответствии с рекомендациями МЭБ и внедрена в лабораторную практику схема всестороннего изучения изолятов вируса ящура с использованием перекрестной реакции микронеутрализации для определения антигенного соответствия изолятов и производственных штаммов. Установлена согласованность результатов РСК и РМН при изучении антигенного родства штаммов вируса ящура.

2. Анализ эпизоотической ситуации по ящуру в России свидетельствует, что в период с 1990 по 2014 г. преобладали вспышки ящура типа О, при этом более масштабными, захватывающими большие территории, были вспышки ящура типа Азия-1 в 2005–2006 гг. и типа А в 2013–2014 гг.

3. Выявлены особенности репродукции в различных клеточных линиях изученных эпизоотических изолятов ВЯ. Титры инфекционной активности изолятов вируса типов А и О, адаптированных к культуре клеток ПСГК-30, достоверно превышали титры вируса, адаптированного к культурам клеток СП и IB-RS-2. Титры инфекционной активности вируса типа Азия-1 при размножении в культурах клеток СП, ПСГК-30 и IB-RS-2 достоверно не различались.

4. Определено, что изоляты вируса ящура типов А, О, Азия-1 после адаптации к культуре клеток ПСГК-30 на уровне 3–5 последовательных пассажей сохраняют патогенность для естественно-восприимчивых животных при экспериментальном заражении.

5. Изоляты вируса ящура О №2102/Забайкальский/2010, О №2108/Забайкальский/2010 и О №2212/Приморский/2014, выделенные в Российской Федерации, изучены, паспортизированы, депонированы во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, защищены патентами на изобретения и рекомендованы для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин, изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

6. Изоляты вируса ящура А №2045/Киргизия/2007, выделенный в Киргизской Республике, А № 2155/Забайкальский/2013, А № 2187/Кути/2013, А № 2166/Краснодарский, А №2171/Кабардино-Балкарский/2013, выделенные в Российской Федерации, по антигенным показателям значительно отличались от используемых производственных штаммов вируса ящура типа А и рекомендованы в качестве производственных штаммов для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин и изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

7. Изолят вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенный в России, по антигенным показателям существенно отличался от используемых производственных штаммов и рекомендован в качестве производственного штамма для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин и изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

8. Установлено, что экспериментальные инактивированные культуральные моновалентные вакцины на основе изолятов вируса ящура А №2045/Киргизия/2007, О №2102/Забайкальский/2010, Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 обеспечивают у крупного рогатого скота защитный уровень антител, выявляемый в РМН, что подтверждено результатами контрольного заражения.

9. Средства и методы диагностики, разработанные с использованием депонированных и защищенных патентами РФ штаммов вируса ящура, по результатам участия в ежегодных международных сличительных испытаниях, организованных Всемирной референтной лабораторией ФАО/МЭБ по ящуру и Европейским сообществом референтных лабораторий по ящуру и ВБС в 2009–2017 гг., являются чувствительными и специфичными (чувствительность ИФА для выявления антигена вируса—96%, ИФА для определения антител к вирусу – 97,4%, РМН – 95%, диагностическая специфичность всех методов – 100%).

3.2 Практические предложения

Создана современная схема штаммовой идентификации ВЯ с использованием для определения антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами перекрестной реакции микронеutralизации, отвечающая требованиям МЭБ, на основе, которой разработан ряд нормативных документов.

«Методические указания по отбору, консервированию и транспортировке проб патологического материала и продуктов убоя для лабораторной диагностики ящура», одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 29.09.2005;

«Методика для определения антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура с помощью иммуноферментного анализа» одобрена ученым советом и утверждена директором ФГУ «ВНИИЗЖ» 01.07.2009;

«Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденные Россельхознадзором 13.09.2017;

«Методические указания по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронеutralизации», утвержденные Россельхознадзором, 13.09.2017;

«Промышленный регламент на производство наборов для выявления антигена вируса ящура в иммуноферментном анализе», утв. 04.02.2013;

«Промышленный регламент на производство наборов для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе», утв. 04.02.2013;

«Промышленный регламент на производство сывороток ящурных типо- и штаммоспецифических для серологических реакций», утв. 02.06.2016;

«Промышленный регламент на производство антигенов ящурных штаммоспецифических для серологических реакций», утв. 02.06.2016;

«Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом» СТО 00495527-0203-2013;

«Набор для определения противоящурных антител в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе» СТО 00495527-0116-2013.

3.3. Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты, полученные в ходе исследований иммунобиологических свойств изолятов ВЯ типов А, О, Азия-1 могут быть использованы при разработке новых средств диагностики и профилактики ящура, при изучении антигенных и филогенетических характеристик вновь появляющихся изолятов.

4. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК

1. Влияние РН суспензии клеток ВНК-21 на репродукцию вируса ящура / А.П. Пономарев, О.Г. Андреева, В.А. Мищенко, **С.Р. Кременчугская** // Ветеринария. – 1996. – № 12. – С. 22-27.
2. Современная схема по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура / Н.Е. Камалова, В.К. Спириц, **С.Р. Кременчугская**, А.И. Егорова // Ветеринария. – 2007. – № 7. – С. 27-30.
3. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире и меры борьбы с ним / А.М. Рахманов, В.В. Борисов, В.В. Михалишин, **С.Р. Кременчугская** // Ветеринария. – 2007. – № 11. – С. 3-6.
4. Изучение биологических свойств вируса ящура линии А Иран/05 / М.В. Жильцова, **С.Р. Кременчугская**, А.И. Егорова, В.В.Борисов // Российский ветеринарный журн. С.–х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – С.15-16.
5. О новом вакцинном штамме вируса ящура типа Азия-1 / **С.Р. Кременчугская**, В.И. Диев, В.В. Михалишин, В.М. Захаров // Российский ветеринарный журн. С.–х. животные. – 2008. – № 3. – С. 5-6.
6. Антигенное соответствие изолятов вируса ящура линии А Иран/05 производственным штаммам типа А₂₂ / **С.Р. Кременчугская**, М.В. Жильцова, В.В. Михалишин, Т.Н. Лезова // Российский ветеринарный журн. С.–х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – С. 16-18.
7. Изучение изолятов вируса ящура типов А, О, Азия-1, выделенных в 2002...2003 гг. в Республике Таджикистан / **С.Р. Кременчугская**, А.В. Щербаков, А.М. Тимина, А.И. Егорова // Российский ветеринарный журн. С.–х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – С. 18-21.
8. Особенности противоящурного вакцинального иммунитета у КРС / В.А. Мищенко, В.М. Захаров, В.И. Диев, **С.Р. Кременчугская**, С.Н. Фомина // Российский ветеринарный журн. С.–х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – С. 28-30.
9. Определение антигенного соответствия эпизоотических изолятов и производственных штаммов вируса ящура с помощью иммуноферментного

- анализа / Н.Е. Камалова, Д.Н. Афолина, А.И. Егорова, **С.Р. Кременчугская**, В.В. Борисов // Ветеринарная патология. – 2009. – № 4. – С. 12-16.
10. Обнаружение антигена вируса ящура типа О в блокирующем варианте иммуноферментного анализа с использованием специфических иммуноглобулинов кролика / Е.Н. Харитоновна, Н.Н. Луговская, **С.Р. Кременчугская**, В.В. Борисов // Ветеринария и кормление. – 2010 – № 6. – С. 33-35.
11. Изучение антигенных свойств изолята вируса ящура типа А/Киргизия/07 // **С.Р. Кременчугская**, Н.Е. Камалова, А.И. Егорова, М.В. Жильцова, Д.Н. Афолина, В.Д. Юрчишин // Ветеринарная патология. – 2010. – № 2. – С. 40-41.
12. Усовершенствование технологии получения препаратов противоящурных антител / Т.К. Майорова, Н.Е. Камалова, **С.Р. Кременчугская** // Ветеринария и кормление. – 2011. – № 6. – С. 34-35.
13. Испытание адъювантов серии Montanide для получения детекторных антител к вирусу ящура / Т.К. Майорова, **С.Р. Кременчугская**, Н.Е. Камалова, В.В. Борисов // Ветеринарный врач. – 2011. – № 5. – С. 29-32.
14. **Кременчугская, С.Р.** Серологическая оценка противоящурного иммунитета у крупного рогатого скота после иммунизации вакцинами с различными адъювантами / С.Р. Кременчугская, В.М. Гуленкин // Ветеринарная патология. – 2012. – № 2. – С. 30-35.
15. **Кременчугская, С.Р.** Штаммовая дифференциация вируса ящура / С.Р. Кременчугская // Ветеринария и кормление. – 2013. – № 5: Материалы Междунар. науч. - практ. конф. «Достижения и перспективы рос. вет. науки», посвящ. 55-летию ФГБУ «ВНИИЗЖ». – С. 23-24.
16. Результаты изучения изолятов вируса ящура типа О, вызвавших вспышки в Забайкальском крае в 2010–2011 гг. / **С.Р. Кременчугская**, Н.Е. Камалова, А.В. Мищенко, Т.К. Майорова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2015. – №1 (25). – С. 34-38.
17. Луговская, Н.Н. Анализ результатов квалификационных сличительных испытаний, проведенных референтной лабораторией диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2013–2015 гг. / Н.Н. Луговская, **С.Р. Кременчугская** // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3. – С. 19-26.
18. Изучение гуморального иммунитета у животных, иммунизированных эмульсионными противоящурными вакцинами / **С.Р. Кременчугская**, Н.Н. Луговская, Т.К. Майорова, А.С. Шарыпов // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 1. – С. 55-57.
19. Фунтиков, А.А. Вспышки ящура на территории Южной Кореи и экономические последствия / А.А. Фунтиков, **С.Р. Кременчугская** // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 1. – С. 30-33.
20. Изучение иммунобиологических свойств изолятов вируса ящура типа О, выделенных на территории Южной Кореи / А.А. Фунтиков, **С.Р. Кременчугская**, Т. К. Майорова, С.Н. Фомина, Д.А. Лозовой, В.М. Захаров // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1. – С. 49-54.

Авторские свидетельства на изобретение и патенты

21. А. с. №1615917 «Адьювант» МПК А61К 39/135 (1995.01) / А.И. Дудников, Н.С. Мамков, В.Ю. Савельев, В.А. Мищенко, Ж.А. Шажко, А.П. Пономарев, **С.Р. Кременчугская**, М.А. Базаров, О.С. Пузанкова, Т.А. Фомина, В.В. Михалишин, В.И. Шипилов; ВНИИИ. – № 4690392/13; заявл. 10.05.1989; опубл. 10.11.1995.
22. Пат. 2348690 РФ, МПК8 С12N 7/00. Штамм «Амурский» № 1987 вируса ящура типа Азия-1 для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа Азия-1 / К.Н. Груздев, **С.Р. Кременчугская**, В.М. Захаров, В.К. Спирин, Н.Е. Камалова, А.И. Егорова, С.Н. Фомина, М.В. Жильцова, А.В. Щербаков, А.М. Тимина, Д.В. Михалишин, Т. Н. Лезова, В.И. Диев; ФГУ «ВНИИЗЖ». – № 2007112591/13; заявл. 04.04.2007; опубл. 10.03.2009, Бюл. № 7.
23. Пат. 2451745 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм А 2045/Киргизия/2007 вируса ящура *Arphtae epizooticae* типа А для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа А / Е.В. Белик, В.В. Борисов, А.В. Щербаков, **С.Р. Кременчугская**, В.В. Михалишин, Н.Е. Камалова, А.М. Тимина, М.В. Жильцова, Д.В. Михалишин, В.Д. Юрчишин, Т.Н. Лезова; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2010131315/10; заявл. 26.07.2010; опубл. 27.05.2012, Бюл. № 15.
24. Пат. 2553219 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм вируса ящура *Arphtae epizooticae* типа А для контроля антигенной и иммуногенной активности и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа А / А.В. Мищенко, Т.К. Майорова, О.С. Румянцева, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Щербаков, Д.А. Лозовой, Д.В. Михалишин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2014106049/10; заявл. 19.02.2014; опубл. 10.06.2015, Бюл. № 16.
25. Пат. 2560268 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм вируса ящура *Arphtae epizooticae* типа А для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа А и их контроля / А.В. Мищенко, Т.К. Майорова, О.С. Румянцева, **С.Р. Кременчугская**, Д.А. Лозовой, Д.В. Михалишин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2014106044/10; заявл. 19.02.2014; опубл. 20.08.2015, Бюл. № 23.
26. Пат. 2563522 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм О №2102/Забайкальский/2010 вируса ящура *Arphtae epizooticae* типа О для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О / В.В. Дрыгин, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, В.В. Никифоров, А.В. Щербаков, Т.К. Майорова, О.С. Румянцева, А.В. Константинов, Д.В. Михалишин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2014132227/10; заявл. 06.08.2014; опубл. 20.09.2015, Бюл. № 26.
27. Пат. 2575801 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм О №2108/Забайкальский/2010 вируса ящура *Arphtae epizooticae* типа О для изготовления биопрепаратов для диагностики ящура типа О / В.В. Дрыгин, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Мищенко, В.В. Никифоров, А.В. Щербаков, Н.Е. Камалова, Т.К. Майорова, М.В. Жильцова, А.М. Тимина, Д.Н. Афолина; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2014145965/10; заявл. 18.11.2014; опубл. 20.02.2016, Бюл. № 5.

28. Пат. 2603255 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм А №2155/Забайкальский/2013 вируса ящура Arh₁ae epizooticae типа А для контроля антигенной и иммуногенной активности для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа А / Д.А. Лозовой, А.В. Мищенко, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Щербаков, Д.В. Михалишин, Т.К. Майорова, Н.Н. Луговская, О.С. Румянцева, В.И. Диев; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2015115872/10; заявл. 28.04.2015; опубл. 27.11.2016, Бюл. № 33.

29. Пат. 2604200 РФ, МПК С12N 7/00. Штамм А №2166/Краснодарский/2013 вируса ящура Arh₁ae epizooticae типа А для контроля антигенной и иммуногенной активности для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа А / Д.А. Лозовой, А.В. Мищенко, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Щербаков, Д.В. Михалишин, К.С. Малкова, И.Г. Камалов, Т.К. Майорова, А.М. Тимина, В.И. Диев; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2015115869/10; заявл. 28.04.2015; опубл. 10.12.2016, Бюл. № 34.

30. Пат. 2650768 РФ МПК С12N 7/00. Штамм О №2212/Приморский/2014 вируса ящура Arh₁ae epizooticae типа О для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О / Д.А. Лозовой, А.В. Мищенко, Д.В. Михалишин, А.В. Константинов, А.В. Борисов, С.Н. Фомина, **С.Р. Кременчугская**, А.В. Щербаков, Т.К. Майорова, М.А. Шевченко; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2016140459; заявл. 14.10.2016; опубл. 17.04.2018, Бюл. № 11.