

**“НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ОЦЕНКИ И АНАЛИЗА РИСКОВ БЕЗОПАСНОСТИ
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ” ГНКО**

САРКИСЯН ХАЧИК ВАЗГЕНОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ
ВИРУСОВ ТРАНСГРАНИЧНЫХ БОЛЕЗНЕЙ (ЯЩУР И
АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ) В РЕСПУБЛИКЕ АРМЕНИЯ**

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по
специальности 16.00.01 - “Ветеринария”**

ЕРЕВАН-2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Историческая справка	15
1.2 Эпизоотология	17
<i>1.2.1 Эпизоотология ящура</i>	17
<i>1.2.2. Эпизоотология АЧС</i>	22
1.3. Возбудители и их свойства	27
<i>1.3.1. Возбудитель ящура</i>	27
<i>1.3.2 Возбудитель АЧС</i>	30
1.4. Изменчивость антигенных свойств вируса ящура	33
1.5. Клиническая картина и патологоанатомические изменения при ящуре и АЧС ...	38
1.6. Диагностика и культивирование вирусов ящура и АЧС	43
1.7. Технология изготовления инактивированной противоящурной вакцины	51
1.8 Средства специфической профилактики ящура	54
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	60
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ГЛАВА III. ЯЩУР	73
3.1. Занос экзотических типов вируса ящура на территорию Армении и анализ эпизоотических данных	73
3.2. Идентификация эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных на территории Армении и Нагорно-Карабахской Республики (НКР) в 1998-2007 гг.	79
3.3. Изучение иммунобиологических свойств выделенных в Армении (1998-2016 гг.) изолятов вируса ящура	82
<i>3.3.1. Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура типа А – “Армения/98”</i>	82
<i>3.3.2. Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура типа О №1920/Армения/2002</i>	86
<i>3.3.3. Изучение иммунобиологических свойств эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1933 Армения/2000, выделенного в Армении</i>	91
3.4. Культивирование изолятов ящура А-98, О-2002, О-НКР-2007, Азия-1-2000	93
<i>3.4.1. Адаптация вируса ящура различного происхождения к перевиваемой линии</i>	

<i>клеток почек сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почек сирийского хомячка (ВНК-21).</i>	93
<i>3.4.2. Множественность заражения.</i>	98
<i>3.4.3. Сравнительное изучение чувствительности новых культур клеток к вирусу ящура.</i>	100
3.5. Получение и усовершенствование технологии изготовления экспериментальной серии вакцин против ящура	102
<i>3.5.1 Изучение авирулентности, безвредности и иммунологической эффективности приготовленных вакцин из вирусов ящура штамма Армения/98.</i>	109
<i>3.5.2. Эффективность противоящурной вакцины из штамма О №1920 “Армения” 2002 против эпизоотического штамма О №2041-2007, выделенного в Нагорно-Карабахской Республике (НКР)</i>	112
<i>3.5.3. Изучение иммуногенной активности эмульсионной и сорбированной противоящурной вакцин из штамма Азия-1 №1933/Армения/2000 на крупном рогатом скоте и свиньях.</i>	115
3.6. Стратегия и тактика по профилактике и борьбе с ящуром в Армении на современном этапе.	119
ГЛАВА IV. АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ	124
4.1. Занос и анализ причин заноса и распространения экзотического вируса АЧС ...	124
4.2. Выделение эпизоотического вируса АЧС на территории Армении и НКР в 2007-2011гг. и его идентификация	129
4.3. Патогенность для свиней.	134
4.4. Культивирование изолятов вируса АЧС выделенных в Армении.	136
4.5. Вирулентные свойства вируса АЧС.	142
4.6. Изучение роли диких кабанов и клещей в качестве резервуара и переносчиков вируса АЧС	143
4.7. Профилактика АЧС.	155
ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	158
ВЫВОДЫ	164
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	166
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	167
ПРИЛОЖЕНИЕ	207

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧС – Африканская чума свиней

АЭЭИ – Аминоэтилэтиленимин

БОЕ- Бляшкообразующие единицы

ВАЧС – Вирус африканской чумы свиней

ВНА – Вируснейтрализирующие антитела

ВНИИВВиМ - Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

ВНК-21 – Перевиваемая клеточная культура почки сирийского хомячка

ВТО – Всемирная торговая организация

ВФДП – Всемирный фонд дикой природы

ВЭР – Высокий эпизоотический риск

ВЯ – Вирус ящура

ГАД₅₀ – Гемадсорбирующее действие

ГAE₅₀ – Гемадсорбирующие единицы

ГИС – Геоинформационная система

ГОА – Гидрат окиси алюминия

ГОСТ – Государственный стандарт

ГПОИ – Государственная природоохранная инспекция

ГСБПП МСХ РА – Государственная служба безопасности пищевых продуктов Министерства сельского хозяйства Республики Армения

ДЖЗ – Департамент животноводства и зоотехнии

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПВ – День после вакцинации

ДСМЭР – Департамент статистики министерства экономического развития

ЕК – Европейская комиссия

ЕС – Европейский Союз

ИБ – Иммуноблоттинг

ИД – Инфицирующая доза

ИмД₅₀ – Пятидесятипроцентная иммунизирующая доза

ИПС – Инфекционно паразитарная система

ИФА – Иммуноферментный анализ

КВЯ – Культуральный вирус ящура

ККИД₅₀ – Клеточных культуральных инфекционных доз

ККМС – Культура клеток костного мозга

ККЛ – Культура клеток лейкоцитов

КМ – Костный мозг

КНР – Китайская Народная Республика

КПП – Контрольно пропускной пункт

КРС – Крупный рогатый скот

КС-титр – Комплимент связывающий титр

КСТ – Коронарные сосуды теленка

КЧС – Классическая чума свиней

ЛД₅₀ – Пятидесятипроцентная летальная доза

МДВК – Культура клеток почки теленка

МОП – Министерство охраны природы

МПД – Максимально переносимая доза

МРС – Мелкий рогатый скот

МС – Морские свинки

МСХ – Министерство сельского хозяйства

МУ – Методические указания

МЭБ – Международное эпизоотическое бюро

НАН – Национальная академия наук

НАУА – Национальный аграрный университет Армении

НИИЗЖ – Научно-исследовательский институт здоровья животных

НКР – Нагорно-Карабахская Республика

НСБППФВ – Национальная служба безопасности пищевых продуктов, фитосанитарии и ветеринарии

НСС – Национальная статистическая служба

НЦЖВ – Научный центр животноводства и ветеринарии

НЦЗГЭ – Научный центр зоологии и гидроэкологии

НЦОАРБПП – Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов

ОП – Оптимальная плотность

ПБЖР – Панафриканское бюро животных ресурсов

ПД – Прививная доза

ПКВП – Пограничный контрольный ветеринарный пункт

ПКИ – Показатель кумулятивной инцидентности

ПНР – Общее поголовье домашних свиней в неблагополучных по АЧС районах

ПОР – Показатель относительного риска

ППР – Общее поголовье домашних свиней, подверженное риску АЧС в течении месяца

ППХ – Приусадебное подсобное хозяйство

ПСГК-30 – Почка сибирского горного козерога

ПСТ – Показатель смертности от АЧС по отношению к ППР в течении месяца

ПЦР – Полимеразно-цепная реакция

ПЦР-РВ – Полимеразно-цепная реакция реального времени

ПЭГ – Полиэтиленгликоль

ПЭИ – Полиэтиленимин

ПЭПА - Полиэтиленполиамин

РГАД – Реакция гемадсорбции

РН – Реакция нейтрализации

РНПИФ – Реакция непрямой иммунофлюоресценции

РПИФ – Реакция прямой иммунофлюоресценции

РСК – Реакция связывания комплимента

РФ – Российская Федерация

РЦВД – Районный центр ветеринарного департамента

РЦВД – Республиканский центр ветеринарной диагностики

СКНЖ – Санитарный кодекс наземных животных

СП – Первичная культура клеток почек свиней

ТБЖ – Трансграничные болезни животных

ТУ – Технические условия

ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза

ФАО – Сельскохозяйственная и продовольственная организация

ФГУ ВНИИЗЖ – Федеральное Государственное учреждение “Федеральный центр охраны здоровья животных”

ФИТЦ – Реагент для реакции прямой иммунофлюоресценции

ЦПД – Цитопатическое действие

ЮАР – Южно-Африканская республика

ЮФО – Южно-федеральный округ

IB-RS-2 – Перевиваемая клеточная культура свиного происхождения

lg – Десятичный логарифм

log₂ – Логарифм при основании “2”

PD₅₀ – Защитная доза

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование транспортных средств наряду с глобализацией международных торгово-экономических связей существенно повлияло на изменение ареалов ряда экзотических болезней животных, очаги которых, в силу различных причин сохранились в развивающихся странах. Некоторые из таких болезней (ящур и АЧС) способные распространяться на большие расстояния и в течение короткого времени достигать эпизоотических пропорций, последовательно или одновременно охватывая поголовье скота в нескольких странах, определены Международным Эпизоотическим Бюро как трансграничные болезни животных. Последние являются не только одним из основных факторов, сдерживающих развитие животноводства в мире, но и глобальным риском для развития международной торговли продуктами животного происхождения. Об этом свидетельствуют сообщения как о вспышках ТБЖ, так и о наложении ветеринарно-санитарных ограничений на импорт животноводческой продукции из стран неблагополучных по ТБЖ, регулярно поступающие в МЭБ от государственных ветеринарных служб. В соответствии с современной международной классификацией, ящур включен в список болезней Всемирной Организации Здравоохранения животных, подлежащих обязательному декларированию, в категорию “Болезни разных видов животных” вследствие того, что им могут болеть сельскохозяйственные и дикие животные более 100 видов [67, 82, 83].

Эпизоотическая ситуация по ящурю в мире, в том числе и в соседних с Арменией странах, остается напряженной, поэтому велика вероятность заноса возбудителя в нашу страну. В связи с этим, необходимо дальнейшее осуществление систематических мониторинговых исследований, в первую очередь в зонах с высокой степенью риска заноса и распространения ящура, с целью контроля иммунного фона, а также выявления возможного скрытого переболевания животных и вирусоносительства среди них [14, 56]. Особую тревогу у стран-участников МЭБ вызывает также эпизоотическая обстановка по АЧС, которая относится к числу наиболее опасных ТБЖ. Данное заболевание отличается от остальных ТБЖ рядом эпизоотологических особенностей, а именно чрезвычайно высокой контагиозностью, достаточно узкой гостальной специфичностью, выраженной двойственностью проявления, крайне высокой летальностью и отсутствием средств лечения

и специфической профилактики. Многочисленные данные относительно развития эпизоотической ситуации по АЧС в мире на протяжении прошлого столетия свидетельствуют, что благодаря морфологическим и биологическим критериям своего возбудителя эта экзотическая инфекция может неожиданно вспыхнуть практически в любом регионе мира. Данное опасение еще раз подтвердилось в июне 2007 года, когда МЭБ объявило о вспышке АЧС на территории Грузии. За сравнительно короткий период течение заболевания приобрело характер опустошительной эпизоотии, которая охватила поголовья домашних свиней почти во всех регионах Грузии и распространилась на территорию Армении [143, 218, 246, 379]. В августе 2007 года Государственная ветеринарная служба Армении оповестила МЭБ о вспышке инфекции на подведомственной ей территории, после чего страна была включена в список стран официально неблагополучных по АЧС. Таким образом, помимо прямого экономического ущерба в результате эпизоотии, неблагополучие по заболеванию привело также и к непрямым экономическим потерям, в результате наложения Всемирной Торговой Организацией дополнительных санкций на экспорт продукции животного происхождения. Несмотря на то что эпизоотическая обстановка по АЧС в Армении продолжает оставаться стабильно напряженной, масштабных исследований в этом направлении не проводилось. В литературе имеются отдельные сообщения относительно эпизоотического проявления АЧС на территории Армении, однако авторы этих работ основное внимание уделяют симптоматологии и патогенезу заболевания на организменном уровне. Вышеизложенное побудило нас заняться изучением проявления инфекции на популяционном уровне, а также причинно-следственных связей лежащих в основе эпизоотического процесса [55].

Актуальность темы Ящур – высококонтагиозное, экономически значимое вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных животных. Он эндемичен или периодически возникает в соседних странах – в Турции и Иране, что создает постоянную угрозу заноса инфекции в Армению. Так, например, зарегистрированные в нашей стране в 1998, 2000, 2002, 2007, 2016 гг. вспышки ящура стали следствием заноса инфекции из Турции.

В таких условиях особое значение приобретают высокоспецифичные методы быстрой диагностики инфекции. В связи с этим, начиная с 1998 г. главная стратегическая задача

состояла в том, чтобы сдерживать проникновение экзотических типов ящура из сопредельных стран путем создания мощных буферных зон, с целью обеспечения устойчивого благополучия на территории республики. Эта задача была успешно решена. Систематическая вакцинация всего поголовья крупного и мелкого рогатого скота вакцинами с высокой протективной активностью способствовала стабилизации ситуации. Однако, достигнутые позиции и положительные результаты уже в 1998-2002 гг. были полностью утеряны. Даже в пограничных районах не удалось создание большой прослойки (70-75%) популяции иммунных животных. Чрезвычайная заразительность ящура, огромные размеры причиняемого ущерба, особое географическое расположение республики, специфика отгонного животноводства, опасность заноса экзотических типов вируса из постоянно неблагополучных сопредельных Ирана и Турции обострили эпизоотическую ситуацию. За период с 1998 по 2016 гг. в Армении были установлены пять эпизоотические вспышки ящура, вызванные вирусами типа А (1998, 2016), Азия-1 (2000) и О (2002, 2007, НКР). Кроме того, неординарность ситуации заключалась в том, что выделенные изоляты вирусов типа О, А и Азия-1 имели значительные антигенные различия от производственных штаммов и, тем самым, применяемые средства активной профилактики оказались малоэффективными. Такое положение дел и наметило пути совершенствования технологии изготовления инактивированных вакцин из культурального вируса из полевых штаммов. Кроме того, в процессе работы направление исследований было определено в плане замены ингредиентов вакцины, а именно, инактивация димера АЭИИ, который позволил бы получить безопасную вакцину, обеспечивающую у привитых животных формирование более напряженного и продолжительного иммунитета. Значительное обострение эпизоотической ситуации в последние годы диктует необходимость в совершенствовании всего комплекса противоящурных мероприятий и изыскание новых подходов к решению этой проблемы.

Исходя из вышеизложенного представляется актуальным пересмотр стратегии борьбы на современном этапе и активизации комплекса исследований в плане высокоспецифичных методов быстрой диагностики инфекции, оперативного слежения за ситуацией, широкого серомониторинга и анализа эффективности профилактических мероприятий.

АЧС – Географическое расположение и общность границ со стационарно неблагополучными по ТБЖ государствами в течение ряда лет определяли Армению в зону повышенного эпизоотического риска. Особенно ощутимые изменения эпизоотической обстановки произошли в 2007 году, когда в страну была занесена АЧС. В течение нескольких месяцев заболевание распространилось на территорию практически всех областей страны, причиняя огромный экономический ущерб самым необеспеченным слоям населения и подрывая динамичное развитие свиноводческого сектора. В течение последующих лет инфекция не теряла своей эпизоотической опасности, и несмотря на все предпринимаемые меры, ее спорадические вспышки продолжали регистрироваться в различных районах. В настоящее время проблема АЧС продолжает оставаться одной из самых сложных в истории борьбы с ТБЖ в Армении. Актуальность и необходимость изучения биологических свойств для разработки методов экстренной защиты восприимчивого поголовья от этого заболевания не вызывает сомнений.

Цель и задачи исследований. Главной целью исследований явилось выделение и изучение биологических свойств вирусов ящура и африканской чумы свиней. В соответствии с вышеуказанной целью перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить занос экзотических вирусов ящура и АЧС на территорию Армении.
2. Провести диагностику и идентификацию эпизоотических изолятов вируса ящура и АЧС, выделенных на территории Армении и Нагорно-Карабахской Республики (НКР) в 1998-2016гг.
3. Изучить иммунобиологические свойства выделенных изолятов вируса ящура (1998-2016гг.) и АЧС (2007-2011гг.) в Армении и НКР.
4. Провести анализ эпизоотических данных по ящуру и АЧС в Армении.
5. Провести культивирование выделенных изолятов вирусов ящура и АЧС.
6. Получить и усовершенствовать технологию изготовления экспериментальной серии вакцин против ящура.
7. Изучить авирулентность, безвредность и иммунологическую эффективность приготовленных вакцин из вирусов ящура.
8. Изучить роль кровососущих в качестве переносчиков и резервуара вируса АЧС.

9. Совершенствовать стратегию и тактику по профилактике и борьбе с ящуром и АЧС в Армении на современном этапе.

Научная новизна работы (Положения, выносимые на защиту) – Научная новизна результатов, полученных при выполнении работы состоит в следующем:

1. Изучены пути заноса экзотических изолятов вирусов ящура и АЧС на территорию Армении.
2. Определены их иммунобиологические свойства
3. Изучены культуральные свойства выделенных изолятов вируса ящура и АЧС
4. Получены и усовершенствованы технологии изготовления экспериментальных серий вакцин против ящура.
5. Определены основные параметры инактивации вируса с использованием нового способа получения АЭЭИ, с целью изготовления безопасной противоящурной вакцины.
6. Разработана стратегия и тактика по профилактике и борьбе с ящуром и АЧС животных в Армении на современном этапе.

Практическая значимость и реализация результатов исследований

Для практического использования подготовлены и утверждены “Инструкция по предупреждению и ликвидации ящура с/х животных”, “Инструкция по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней в Республике Армения”, технические условия по приготовлению универсальной одновалентной и поливалентной вакцин “А”, “О”, “Азия-1” и поливалентной вакцины против ящура типов “А”, “О”, “Азия-1”. Установлена первичная структура участка генома вируса ящура типов А-98, А-2016, О-2002, О-НКР-2007 и Азия-1-2000. Доказано, что эти изоляты значительно отличаются от производственных штаммов А₂₂№550, О№194 и Азия-1 №48. Получены вакцинные штаммы вируса ящура А-98, О-2002, НКР-2007, Азия-1-2000. Подготовлены технические условия по применению раствора 2-аминоэтил этиленимина (димер этиленимина) для инактивации вируса ящура.

Вопросы, выносимые на защиту

- Занос экзотических типов вируса ящура на территорию Армении и анализ эпизоотических данных
- Идентификация эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных на территории Армении и Нагорно-Карабахской Республики (НКР) в 1998-2007 гг.
- Изучение иммунобиологических свойств выделенных в Армении (1998-2016гг.) изолятов вируса ящура
- Культивирование изолятов ящура А-98, О-2002, О-НКР-2007, Азия-1-2000
- Получение и усовершенствование технологии изготовления экспериментальной серии вакцин против ящура
- Стратегия и тактика по профилактике и борьбе с ящуром в Армении на современном этапе
- Занос и анализ причин заноса и распространения экзотического вируса АЧС
- Выделение эпизоотического вируса АЧС и его идентификация, на территории Армении и НКР в 2007-2011гг.
- Патогенность для свиней
- Культивирование изолятов вируса АЧС выделенных в Армении
- Вирулентные свойства вируса АЧС
- Изучение роли диких кабанов и клещей в качестве резервуара и переносчиков вируса АЧС
- Профилактика АЧС

Апробация работы – Материалы диссертации и основные ее положения доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета научного центра оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов (2010, 2016), заседаниях ученого совета ФГУ “Федеральный центр охраны здоровья животных” (ФГУ “ВНИИЗЖ”) (2008), региональном семинаре по разработке долгосрочной стратегии управления ящуром для Западной Евразии, Шираз, Иран, 9.11-13.11.2008г., Международной конференции “Проблемы повышения производительности с/х продукции и внедрения новых технологий”, посвященной 50-летию научного центра почвоведения, агрохимии и мелиорации им.Гранта Петросяна МСХ РА, Ереван, 2008г., Международной научной конференции ГАУА “Охрана и использование

водных ресурсов южно-Кавказского региона”, Ереван, 2009г., Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности “Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов”, г.Щелково, 9-10 декабря 2009г., Международной научной конференции ГАУА, посвященной 80-летию основания Государственного аграрного университета Армении, Ереван, 21-23 октября 2010г., Международной научной конференции ГАУА “Современные проблемы экологического и органического сельского хозяйства”, Ереван, 9-12 ноября 2011г., 6-ом Международном научном симпозиуме, посвященном инфекционным болезням свиней, г.Барселона, Испания, 10-16 июня 2011г., Международной научной конференции “Экспериментальная и клиническая медицина” 15-21 сентября 2013г., г.Харьков, Украина, научной конференции НАУА, посвященной проблемам безопасности пищевых продуктов и продовольственной обеспеченности, 16-18 октября 2014г., Ереван, 33-ем годовом симпозиуме, организованном союзом вирусологов Америки, 20-26 июня 2014г., США, Форт Колинз, научной конференции посвященной биозащите и изучению особо опасных инфекций 7-13 февраля 2015г., Вашингтон, США

Публикации – По материалам диссертации опубликовано 27 работ (в различных научных изданиях СНГ и за рубежом) и 3 авторских свидетельств.

Объем и структура диссертации – Диссертация изложена на 207 листах и включает: введение, обзор литературы, материал и методы, собственные исследования (ящур, африканская чума свиней), обсуждение результатов исследований, практические предложения, выводы, список литературы, приложения. Работа иллюстрирована 34 таблицами, 14 рисунками и 11 фотографиями.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Историческая справка

Ящур – опасная острая высококонтагиозная вирусная болезнь парнокопытных сельскохозяйственных и диких животных более 100 различных видов (КРС, МРС, свиней, буйволов, сайгаков, косуль, оленей, лосей и других), а также мозолоногих (верблюдов), характеризующаяся лихорадкой, слюнотечением, афтозно-эрозийными поражениями слизистой оболочки языка и ротовой полости, кожи носового зеркальца, конечностей, молочных желез, миокардитом и миозитом, высокой смертностью молодняка первых дней жизни[11].

Возбудитель относится к семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Известно 7 типов вируса: О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3 и множество их вариантов. Преимущественное распространение имеют типы О, А, Азия-1 и SAT-2. Животные, переболевшие ящуром одного типа, могут повторно заболеть в случае заражения вирусом другого типа. Источником возбудителя инфекции являются инфицированные, больные животные, а также животные-реконвалесценты, которые длительно могут быть вирусоносителями. Впервые заболевание с симптомами, сходными с таковыми при ящуре, описал в 1546 году Фракасториус [259]. В 1897 году Леффлеру и Фрошу [291] удалось доказать, что ящур вызывается фильтрующимся вирусом.

С тех пор ветеринарные исследователи всех стран мира стремятся к тому, чтобы наиболее полно изучить свойства вируса, разработать быстрые и надежные методы диагностики, изыскать эффективные средства защиты восприимчивого поголовья животных и разработать эффективные меры ликвидации возникающих эпизоотий.

Трудности, с которыми исследователи столкнулись при разработке средств специфической профилактики, в значительной мере были обусловлены широкой изменчивостью возбудителя ящура и наличием плюралитета.

Плюралитет – это множественность иммунологических типов вируса ящура в пределах вида. В литературе имеется много сообщений о случаях повторного переболевания ящуром домашних животных [31, 193, 224, 356, 374, 380, 382,426].

Повторное переболевание скота ящуром некоторые исследователи [63] связывали с повышенной вирулентностью отдельных штаммов вируса. Другие авторы [201, 223] этот факт объясняли отсутствием напряженного иммунитета у переболевших ящуром животных. И только в 1921-1922 гг. удалось выяснить истинную причину возникновения повторных эпизоотий ящура. В это время Валле и Карре [411, 412, 413] впервые выявили иммуно-биологические различия штаммов вируса ящура. Ими было идентифицировано два типа вируса ящура: тип О, названный по происхождению штамма, выделенного в департаменте Уаза (Oise) во Франции, и тип А, названный по происхождению штамма вируса, выделенного в Арденнах, в Пруссии (Allemaque).

Позже, в 1926 году, Вальдман и Траутвейн [419] подтвердили данные французских ученых и установили наличие в природе нового третьего типа вируса ящура, названного ими типом С. Плюралитет вируса ящура был принципиально подтвержден в последующие годы рядом исследователей [11, 52, 78, 121, 127, 128, 132, 227, 267, 315, 361, 371, 380, 381].

Галлоуэй [261, 262, 263] в образцах вирусного материала, доставленного в различные годы из Южной Африки, дифференцировал три новых иммунологических типа вируса ящура: Sat-1, Sat-2 и Sat-3. Изучая иммунологические свойства штаммов вируса ящура, выделенных в 1954 году в ряде стран Азии, Бруксби и Роджерс [188] открыли новый вид вируса ящура, обозначенный ими как тип Азия-1.

Типы вируса ящура являются неоднородными в иммунобиологическом отношении. Вальдман и Траутвейн [419], а также Бедсон и соавт. [165] высказывали предположение о существовании различий в антигенной структуре у вирусов одного типа. Это предположение было подтверждено Траутвейном и Релпином [407]. С помощью методов перекрестного иммунитета на переболевших морских свинках они установили наличие вариантов вируса ящура внутри одного типа.

Трауб и Мельман [405], применив реакцию связывания комплемента и метод перекрестной серозащиты на морских свинках, подтвердили данные Траутвейна [406] о различии антигенной структуры штаммов внутри одного типа. Ими было установлено три варианта вируса ящура типа А. С этого времени были расширены серологические и иммунологические исследования вариантов вируса ящура [253, 254, 308, 309].

Большой вклад в изучении множественности типов и вариантов ящура внесли отечественные и зарубежные исследователи [2, 4, 23, 26, 32, 38, 46, 58, 62, 83, 87, 90, 94, 113, 114, 126, 199, 255, 256, 274, 298, 299, 384, 410, 414].

Результаты изучения антигенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура, полученные различными исследователями, приведены в соответствующих разделах настоящей работы.

1.2 Эпизоотология

1.2.1 Эпизоотология ящура

При постоянном неблагополучии в сопредельных странах по ящуре на фоне постоянно развивающихся экономических и торговых контактов, предусматривающих закупку сельскохозяйственного сырья и продуктов животного происхождения, создается угроза распространения ящура далеко за пределами неблагополучных очагов. В этом плане борьба с ящуром является мировой проблемой.

- 1996-2000гг. – неблагополучны по ящуре 88 стран, идентифицированы все 7 типов вируса, в некоторых странах – 2-5 типов (Иран, Турция, Индия, Пакистан, Кения, Чад, Южная Америка), преобладают типы О и А [326, 333].
- 1996-1998гг. - Появление в Иране и Турции нового варианта вируса типа А, который вызывал заболевание и у вакцинированных против варианта А₂₂ животных. В 1998 году он был занесен в Армению и Грузию [78, 307, 371].
- 1997г. – эпизоотия ящура типа О на Тайване, больше 6 тыс. очагов, пало и уничтожено свыше 4 млн. свиней
- С 1998г. возрастает число вспышек типа Азия-1. В 1999г. этот тип установлен в Иране (впервые с 1991 года), затем в Турции (впервые с 1973 года), в 2000г. занесен в Армению, Грузию, Грецию, в 2001г. – в Азербайджан, в 2003г. – в Таджикистан [334, 336].
- 1999г. – неблагополучны по ящуре 58 стран, в том числе 30 азиатских, 22 африканских и 6 южноамериканских. Из 4922 зарегистрированных вспышек ящура 3817 (77,5%) установлено в Азии, в том числе тип SAT-2 – в Саудовской Аравии.

- 2000г. – ящур, обусловленный паназиатским штаммом типа О, установлен в длительно благополучных странах: в Японии (КРС), Южной Корее (КРС), Монголии (КРС, МРС, верблюды), в России (свиньи), а также ящур разных типов еще более чем в 40 странах, в том числе в Иране, Турции (типы А, О, Азия-1), Китае, Казахстане, Киргизии, Таджикистане (тип О), Армении (тип Азия-1), Грузии (тип О, Азия-1). Выделенные при этом эпизоотические штаммы и изученные в ФГУ “ВНИИЗЖ” (г. Владимир) и Всемирной референтной лабораторией МЭБ по ящур (Великобритания) (О/Грузия/2000, А/Армения/1998, Азия-1/Грузия/2000, О/Уссурийский/2000) являются антигенно измененными по сравнению с ранее выделенными и используемыми при производстве противоящурных вакцин. ФГУ “ВНИИЗЖ” применяют их для изготовления вакцин, в частности, для буферной зоны [326, 333].
- 2001-2003гг. – ящур зарегистрирован в 76 странах, в том числе в 34 азиатских, 27 африканских, 8 южноамериканских и 7 европейских. Идентифицированы 7 типов, преобладают О и А. В некоторых странах регистрировали 2-5 типов: Иран, Турция, Индия, Пакистан (О, А, Азия-1), Кения (О, А, SAT-1,2,3), ЮАР, Танзания, Уганда (О, SAT-1,2), Малазия, Сирия, Аргентина, Боливия, Эквадор (О, А) [327, 334,335,336].
- 2001г. – крупнейшая эпизоотия, обусловленная паназиатским штаммом типа О в Великобритании (продолжалась более 7 месяцев, возникло 2030 ящурных очагов, убито и уничтожено свыше 4 млн животных), занос в ранее благополучные Северную Ирландию, Республику Ирландия, Францию и Нидерланды. Ящур зарегистрирован также в Иране и Турции (О, А, Азия-1), Монголии, Китае, Казахстане, Киргизии (тип О), Азербайджане и Грузии (Азия-1) [334].
- 2002г. – ящур в Турции (А, О), Иране, Пакистане (О, А, Азия-1), Монголии, Афганистане, Армении, Грузии (тип О), Кувейте (SAT-2) [335].
- 2003г. – ящур в Таджикистане (Азия-1), Киргизии (не типирован), ЮАР Малави, Ливии (SAT-2) [327, 336].
- 2004г. – ящур зарегистрирован в 57 странах, в том числе в Китае, Монголии, Израиле (тип О), в Турции (типы О и А), в Иране, Индии (типы О, А, Азия-1), в Пакистане (типы

О, А, С, Азия-1), в Таджикистане (тип Азия-1), в Грузии (возбудитель не типирован) [337].

- Установлен ящур типа С в Бразилии и SAT-2 в Саудовской Аравии. Занос ящура в Амурскую область России, граничащую с Китаем [18, 51, 80, 84, 97, 317, 326, 327, 328, 333, 334, 335, 336, 337, 338].
- 2000-2005гг. – увеличение числа вспышек, обусловленных вирусом ящура типа Азия-1. Неблагополучными по ящuru этого типа являлись Афганистан, Азербайджан, Армения, Грузия, Иран, Турция, Греция, Бутан, Индия, Китай, Лаос, Монголия, Мьянма, Непал, Пакистан, Таджикистан, Таиланд, Россия [326, 327, 328, 333, 334, 338] .
- 2005г. – эпизоотия ящура типа Азия-1 в Китае (установлен в 7 провинциях в разных частях страны), занос его в Монголию и Россию (Амурская область, Хабаровский и Приморский края) [338].
- 2006г. – Продолжалась эпизоотия ящура типа Азия-1 в Китае, в течение 2006 года зарегистрировано 16 вспышек в 7 провинциях. Два очага ящура типа Азия-1 на границе с Китаем возникли в России (в Читинской и Амурской областях). Широкое распространение ящур получил во Вьетнаме и Иране (типы О и Азия-1), в Египте (тип А), Ботсване (типы SAT-1 и SAT-2), ЮАР (тип SAT-3). Ящур типа О зарегистрирован в Бахрейне, Иордании, Ираке, Йемене, Катаре, Кувейте, ОАЭ, Омане, Палестине, Саудовской Аравии, тип SAT-2 – в Кувейте. Довольно широкое распространение в Иране, Турции, Саудовской Аравии, Иордании и Пакистане получил ящур, обусловленный антигенно отличающимся штаммом вируса А/Иран/05. Случаи заболевания КРС ящуром типа О отмечены в Аргентине, Бразилии и Эквадоре [14, 24, 28, 96, 100, 115, 339, 340].
- 2007г. – В этот период времени сложилась неблагоприятная ситуация в отношении возможного заноса, возникновения и распространения ящура в Армении, в первую очередь из Турции и Ирана, зависящая, в основном, от факторов внешнего характера. Это обусловлено напряженной обстановкой по ящuru в ряде стран, откуда возможен занос вируса в Армению [340].

В 2007г. многие государства оставались неблагополучными по ящуру. Особое внимание следует обратить на обнаружение в январе 2007г. вирусносителей среди КРС в Синьцзян-Уйгурском автономном районе, который располагается на северо-западе КНР, граничит с Казахстаном, Киргизией, Таджикистаном, Монголией, Россией. Вызывает озабоченность появление в январе 2007г. ящура типа Азия-1 в Северной Корее, которая была благополучна по ящуру с 1960 года. В июне 2007г. во Вьетнаме зарегистрировано распространение ящура типа Азия-1 [329].

В 2007г. в Аргентине, Бразилии, Боливии и Эквадоре установлено заболевание КРС и свиней ящуром типа О, откуда возможен занос вируса в Россию при импорте мяса из этих стран.

Значительное распространение в 2007г. получил ящур типа А в Египте, который циркулирует в Африке в течение 9 лет [329, 340].

Установлено, что выделенные в упомянутых странах изоляты формируют отдельную генетическую группу А/Иран/05 и отличаются от штаммов вируса ящура типа А, выявленных в Иране в 1996 и 1999гг. и циркулирующих до этого в Турции. Оказалось, что вакцина, содержащая в своем составе антиген вируса ящура А₂₂, слабо защищает иммунизированных ею животных от вируса А/Иран/05.

Ящур типа SAT-2 установлен в Намибии в 2007г. В Ботсване в 2006-2007гг. зарегистрирован ящур типов SAT-1 и SAT-2 с массовым заболеванием КРС.

В 2007г. ящур типа О зарегистрирован в Израиле, Палестине, Турции, Лаосе, на Кипре, в Боливии и Эквадоре, типа А – в Турции и Египте. [339, 340]

Большую озабоченность у ветеринарных служб европейских стран вызвало возникновение в августе 2007г. ящура типа О в Великобритании, впервые после крупнейшей эпизоотии 2001г.

По официальным данным, в 2007-2008гг. неблагополучными по ящуру были 58 стран, в том числе 28 азиатских, 24 африканских, 4 южноамериканских и 2 европейских. При этом регистрировали ящур 6 известных типов (О, А, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3) [13, 67, 318, 320, 329, 341].

В 2008 г. о возникновении вспышек ящура сообщили в МЭБ 18 азиатских, африканских и южноамериканских государств, в том числе Израиль, Египет, Индия, Лаос, Непал, Шри Ланка, Эквадор, Колумбия (тип О), Ботсвана, Намибия, Малави, ЮАР (тип SAT-2), Бахрейн, Индия, Колумбия (тип А), Индия, Непал, Китай (тип Азия-1), Ливан, Замбия, Мозамбик, Нигерия (тип вируса не установлен) [330].

Определенную озабоченность вызывает продолжающаяся эпизоотия ящура типа Азия-1 в Китае. Несмотря на уничтожение всех животных в ящурных очагах, в течение 2008г. возникли еще 3 вспышки. Особого внимания заслуживает обнаружение вирусоносителей среди КРС Синьцзян-Уйгурском автономном районе, расположенном на северо-западе КНР и граничащем с Казахстаном, Таджикистаном, Киргизией, Монголией и Россией, в котором еще в 2005г. отмечали ящур типа Азия-1. Вспышки его в данном автономном районе регистрировали и в последующем: в феврале 2008г. и в январе 2009г. Кроме того, в январе 2009г. в центральной части КНР в провинции Хубэй установлен ящур типа А, а в марте-апреле 2009г. – типа Азия-1 во внутренней Монголии, в провинциях Сычуань, Хунань, Гуйчжоу и Шэньси. В первом квартале 2009г. вспышки ящура отмечены и в других странах: в Бахрейне, Египте, Израиле, Палестине, Ливане, на Тайване [99, 314, 330, 343].

Необходимо отметить, что по данным многих исследователей, ряд последних вспышек ящура типов О, А и Азия-1 был обусловлен антигенно-измененными штаммами вируса. Это диктует необходимость проведения систематических мониторинговых исследований, а при возникновении новых случаев заболевания требуется оперативное выделение изолятов и их изучение, в первую очередь их соответствия производственным штаммам, используемым для изготовления противоящурных вакцин.

Анализ материалов МЭБ и сообщений СМИ свидетельствует о том, что эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в последние годы остается довольно напряженной. Согласно последним рекомендациям ФАО и МЭБ с учетом генетического родства циркулирующих штаммов вируса ящура неблагоприятные территории мира подразделены на 7 региональных пулов (зон), которые включают страны Восточной Азии (пул №1), Южной Азии (пул №2), Евразии (пул №3), Африки (пулы № 4-6), Южной Америки (пул №7) [154].

Для Армении особую значимость имеет неблагоприятная ситуация в государствах, которые граничат со странами СНГ или расположены вблизи них, а также в государствах, с которыми имеются тесные хозяйственно-экономические, социально-культурные, туристические и другие связи. В 2009г. из 60 неблагополучных государств к таким странам относились 28, и в них регистрировали ящур типов О, А и Азия-1 [82, 98].

В ряде государств установлен ящур 2-3-х типов (Китай, Индия, Иран, Пакистан, Турция, Египет и др.). Вспышки ящура типов А, О и Азия-1 отмечали в Китае, Гонконге, Тайване, Вьетнаме, Камбодже, Мьянме, Лаосе, Малайзии и Таиланде (пул №1). Вирус ящура этих типов также циркулировал в Индии, Бангладеш, Бутане, Непале, Шри-Ланке и Пакистане (пул №2). В Бахрейне, Египте, Иране, Ираке, Израиле, Кувейте, Ливане, Ливии, Палестине, Саудовской Аравии, Турции, Афганистане и ОАЭ (пул №3) регистрировали ящур типов А (генетическая линия А Iran 2005), О (О Panasian) и Азия-1. В странах Восточной Африки (пул №4) выявили вирус ящура типов О, А, SAT-1, SAT-2, SAT-3; Западной Африки (пул №5) – О, А, SAT-1, SAT-2; Южной Африки (пул №6) – SAT-1, SAT-2, SAT-3; Южной Америки (пул №7) – типов О, А. В целом, следует отметить тенденцию последних лет (2010-2012) к расширению ареалов ящура типов О, А, Азия-1 и увеличению количества вспышек, вызванных ими [95,331, 342, 344, 345].

1.2.2. Эпизоотология АЧС

АЧС будучи крайне заразным вирусным заболеванием свиней, проявляется в виде геморрагической лихорадки с почти стопроцентной смертностью. Катастрофическое воздействие заболевания на свиноводство от домашнего хозяйства до коммерческого уровня имеет тяжелые социально-экономические последствия для продовольственной безопасности. АЧС является тяжелым ТЗЖ, способным к стремительному распространению из государства в государство [60, 61].

АЧС впервые описал Монтгомери в 1921 году в Кении. В последствии об АЧС сообщалось из большинства стран Южной и Восточной Африки, где вирус передается либо по древнему лесному циклу между африканскими кабановыми бородавочниками (*Phacochoerus aethiopicus*) и клещами комплекса *Ornithodoros moubata*, либо по домашнему циклу, в который вовлечены свиньи местных пород с участием клещей или без них.

В 1957 году заболевание, почти наверняка привнесенное из Анголы, распространилось по Португалии [163]. Хотя, судя по всему, оно было искоренено, второе проникновение в 1959 году привело к распространению болезни по Иберийскому полуострову и, в последующие годы, по нескольким другим странам Европы, включая Францию, Италию, Мальту, Бельгию и Нидерланды. Однако АЧС пустила глубокие корни только в Испании и Португалии [172, 173, 287], где искоренение было осуществлено через 30 лет, а на итальянском острове Сардиния заболевание остается эндемическим [252, 287, 324]. Вспышка заболевания произошла в Португалии в конце 1999 года и была быстро подавлена.

В 1977 году АЧС распространилась по Кубе [163], где была искоренена ценой гибели 400тыс. свиней. Вспышки имели место в Бразилии и Доминиканской республике в 1978 году, на Гаити в 1979 году и на Кубе в 1980 году [147, 215, 360]. Искоренение заболевания в этих странах было достигнуто посредством массового забоя свиней. Находился ли очаг этих вспышек в Европе или Африке, установить не удалось. Сообщается о вспышке АЧС в бывшем Советском Союзе в 1977 году [43, 272, 324, 422].

Первые сообщения об АЧС в Западной Африке пришли из Сенегала в 1978 году и Камеруна в 1982 году, хотя впоследствии выяснилось, что Нигерия подверглась вспышкам заболевания еще в 1970-ых годах, а современная Республика Кабо-Верде инфицирована с 1960-ых гг. Ведутся дебаты о том, распространилась ли инфекция из центральноафриканских стран или была занесена из Европы. Кроме Демократической Республики Сан-Томе и Принсипи, где АЧС была искоренена в 1992 году, ни одна западноафриканская страна не сообщала об АЧС до 1996 года, когда началась пандемия, в результате которой впервые были заражены несколько стран. Вспышки АЧС произошли также в ранее зараженных странах Западной, Южной и Восточной Африки. Мадагаскар страдает от АЧС с 1997-1998 гг. Маврикий был инфицирован в 2007 году. Высокий уровень активности АЧС во многих странах Африки очевидно угрожает инфекцией и другим регионам.

В июне 2007 года об АЧС заявила Грузия, от которой пострадали большинство районов [143, 218, 246, 379]. В октябре АЧС была подтверждена в Армении, а также в Чечне (юг Российской Федерации), где неподалеку от грузинской границы была отмечена гибель диких кабанов. В 2008 году АЧС была подтверждена и в других областях Российской Федерации.

Восприимчивые животные – Только виды семейства свиней (*Suidae*) восприимчивы к заражению вирусом АЧС [260, 375]. Домашние свиньи крайне восприимчивы к АЧС, независимо от возраста и пола. Однако, в центральной Африке у некоторых местных пород свиней выживаемость также превышает ожидаемый уровень, даже если АЧС вызвана вирулентным штаммом. Эндемическая стойкость вируса может привести к селекции врожденной резистенции среди подверженных заболеванию популяций свиней, независимо от вирулентности. Все дикие африканские свиньи восприимчивы к инфицированию вирусом, но у них не развивается клиническое заболевание [212, 258]. Основными хозяевами вируса АЧС являются бородавочники. Вирус АЧС найден у кистеухой свиньи (*Potamochoerus porcus* и *P. larvatus*) и большой лесной свиньи (*Hylchoerus meinertzhageni*), но их роль в эпидемиологии заболевания неизвестна. Европейский дикий кабан (*Sus scrota*) очень восприимчив к АЧС и приближается по уровню смертности к домашним свиньям [350]. Одичавшие свиньи в американском регионе, возможно, частично происходящие от европейского дикого кабана при экспериментальном инфицировании проявили высокую восприимчивость, как и одомашненные потомки европейского дикого кабана в Южной Африке. Восприимчивость прочих диких свиней в регионах, где АЧС не встречается, не исследовалась за исключением ошейникового пекаря (*Tayassu tajacu*), который оказался совершенно резистентным. Человек не восприимчив к АЧС [270].

Выживаемость вируса – В окружающей среде, в надлежащей белковой среде, вирус АЧС стабилен в широком диапазоне температур и величин рН. Доказана его выживаемость в сыворотке при комнатной температуре в течение 18 месяцев, в замороженной крови в течение 6 лет и в крови при 37°C в течение 1 месяца. Нагревание до 60°C в течение 30 минут лишает вирус активности. В лаборатории вирус АЧС остается заразным на неопределенный срок при -70°C, но может быть инактивизирован, если его долгое время хранить при -20°C [60, 266, 354]. В отсутствии белковой среды его жизнеспособность резко снижается. Вирус АЧС обычно стабилен при рН от 4 до 10, но в благоприятной среде (сыворотка) сохраняет активность при более низких и более высоких показателях от нескольких часов до трех дней. Гниение не инактивирует вирус, который может сохранять жизнеспособность в фекалиях по меньшей мере 11 дней, в разложившейся сыворотке – 15 недель и в костном мозге –

месяцами. С другой стороны, посев вируса из разложившихся образцов зачастую бывает безуспешным, возможно, из-за токсического действия на систему посева внутриклеточных остатков и энзим [60].

Будучи незащищенным, вирус АЧС быстро инактивируется солнечным светом и высушиванием. Доказано, что в тропических странах свинарники не остаются заразными более 3-4 дней даже в отсутствие чистки и дезинфекции. Однако высокий уровень вируса АЧС может сохраняться в богатых белком, влажных средах, например, в жидкой глине [422].

Благодаря толерантности к широкому спектру рН в борьбе с АЧС эффективны только определенные дезинфицирующие средства.

На хозяине, после инфицирования вирусом АЧС, домашние свиньи распространяют заразные количества вируса от 24 до 48 часов до появления клинических признаков. Во время острого периода болезни огромное количество вируса распространяется со всеми выделениями и экскрементами. Большое количество вируса содержится также в крови и тканях. Свиньи, пережившие острый период, остаются заразными еще несколько месяцев, но выделяют вирус не более 30 дней. Как и в случае диких свиней, заразное количество вируса находится только в лимфатических узлах. Прочие ткани едва ли содержат заразное количество вируса спустя более чем два месяца после инфицирования. Точная продолжительность присутствия заразного количества вируса в лимфатических тканях как диких, так и домашних свиней неизвестна, и, возможно, в немалой степени зависит от индивидуальных особенностей. У домашних свиней этот срок не превышает 3-4 месяца [72].

Клещи *Ornithodoros* живут весьма долго и способны к вирусоносительству АЧС в течение нескольких лет лишь с постепенным снижением заразности [423, 424]. Роль клеща *Ornithodoros*, обитающего в свинарниках, носящего и передающего АЧС исчерпывающе доказана как в Африке (Малави), так и в Европе. На Иберийском полуострове *Ornithodoros erraticus* сыграл значительную роль в эндемичности АЧС и, возможно, стал причиной вспышки 1999 года в Португалии, когда свиньи были размещены в заброшенных свинарниках, в которых все еще обитали клещи. Некоторые виды *Ornithodoros*, которые встречаются в Карибском бассейне и Северной Америке, способны носить и передавать

вирус АЧС, но клещи скорее всего не участвовали в карибских вспышках АЧС. *Ornithodoros* не встречается на Сардинии [228].

Как и в случае классической чумы свиней (КЧС), носительство вируса АЧС у домашних свиней в отсутствие клеща *Ornithodoros*, возможно, зависит от наличия большой, непрерывной популяции свиней, высокая рождаемость которых обеспечивает постоянный приток незараженных свиней для инфицирования [270, 365].

В продуктах животноводства способность вируса АЧС сохранять контагиозность в пищевых продуктах, например, в охлажденном мясе (минимум 15 недель, а может, и дольше, если мясо заморожено), в ветчине и колбасе, если их не варили и не коптили при высокой температуре (3-6 месяцев), может весьма способствовать распространению АЧС. Недоваренная свинина, сушеная и засоленная свинина, кровь или мясная туша, полученные от свиней, должны считаться опасными, если они скармливаются свиньям [302, 303, 304].

Передача заболевания: в лесном цикле между бородавочниками и клещами аргасидами из комплекса *Ornithodoros moubata* передача происходит от клещей неонатальным бородавочникам, между клещами, от клещей домашним свиньям. У взрослых бородавочников, даже если они носят заразное количество вируса АЧС в лимфатических сосудах, вирус не выделяется или не развивается вiremия, достаточная для заражения других свиней или клещей, которые паразитируют на крови свиней. Среди клещей *Ornithodoros*, вирус АЧС передается от самцов самкам трансвариально, трансфазовым и половым путем [6, 124, 169, 270, 364, 365, 366].

Исследования большого количества эктопаразитов свиней таких как, свиная вошь, зудень чесоточный и других видов клещей, помимо *Ornithodoros*, которые паразитируют на свиньях, например, *Rhipicephalus*, выявили их неспособность механически носить или передавать вирус АЧС. Доказано, что только жигалка обыкновенная из рода *Stomoxys* носит и передает вирус АЧС в заразных количествах от 24 до 48 часов.

Во время эпизоотии прямой контакт является важнейшим каналом передачи вируса между инфицированными свиньями и их выделениями и экскрементами. Инфицирование обычно происходит ротоносовым путем.

Распространение вируса АЧС фомитами – зараженными транспортными средствами, оборудованием, инструментами и одеждой вероятно при высоком уровне загрязнения окружающей среды. Вероятно ятрогенное распространение через зараженные иглы при вакцинации от КЧС или лечения бактериальных заболеваний, например, рожи свиней, без надлежащей стерилизации или смены игл. Хотя сброс мусора зачастую происходит через реки и иные водоемы, передача через воду весьма маловероятна по причине разбавления вируса. Однако, когда водные пути используются для сбора останков животных, вполне вероятно передача посредством поедания падали; сброс в водные пути также не рекомендуется по другим гигиеническим и разумным природоохранным соображениям. Доказано, что аэрозольная передача происходит только на очень короткие расстояния [75].

Кормление помоями, и особенно пищевыми отходами из самолетов и судов, принято считать важным источником заноса новой инфекции в незараженные районы. Пищевые отходы, состоящие из свинины или содержащие большое количество зараженной свинины, обладают большим потенциалом распространения инфекции и возможно вызывают многие имевшие место вспышки заболевания. Поедание падали и остатков зараженной свинины, выброшенной человеком в процессе приготовления пищи, может достигать значительных масштабов в районах, где свиньи не содержатся в закрытом помещении. Когда случается вспышка, в наличии оказывается большое количество зараженной свинины из-за падежа свиней. Излишки мяса могут высушиваться или подвергаться другим видам обработки, которые не инактивируют вирус, тем самым увеличивая риск скармливания этого мяса свиньям [104].

1.3. Возбудители и их свойства

1.3.1. Возбудитель ящура

Вирус ящура является представителем группы наимельчайших, РНК содержащих, чувствительных к кислой рН пикорнавирусов. По своему строению – это один из наиболее простых вирусов. Он не имеет мембраны и состоит из центрального ядра – простой цепочки РНК и наружной белковой капсулы, в свою очередь состоящей из капсомер. В связи с отсутствием в химическом составе вируса липидов, он не разрушается под действием эфира.

Путем осаждения спиртом, извлечения органическими растворителями и трех циклов ультрацентрифугирования в градиентах плотности получают очищенный на 94% вирус, состоящий из 31,5+1,5% РНК и 68,5% белка. По данным Перевозчикова Н.А. и сотрудников [92] в состав РНК вируса ящура входят гуанин, аденин, цитозин и урацил в молекулярных соотношениях 0,24; 0,26; 0,28; 0,22 соответственно. Дубра и Браун [189, 226] установили, что константа седиментации РНК вирусной частицы составляет 37 S, а ее молекулярный вес – 3×10^6 . Считают, что малые вирусы, такие как вирус ящура, содержат от 4000 до 6000 нуклеотидов, что может соответствовать генетической информации для синтеза пептидной цепи из 1500-2000 аминокислот.

По данным Брауна [190] вирусная частица весит примерно 10^{-17} грамма, следовательно, вирусная суспензия с титром 10^8 /мл содержит 10^{-9} г инфекционного вируса на мл.

В исследованиях Бриза и Траутмана [180] получены данные, свидетельствующие о том, что вирус ящура имеет в диаметре 220-250 Å и под электронным микроскопом обнаруживает кубическую форму строения с 42 капсомерами. Несколько позже Бриз и сотр. [181], применив метод ротационной симметрии, уточнили, что вирус ящура состоит из 32 капсомер, образующих ромбический триконтаэдр.

Капсомеры [388, 389] представляют собой образования более или менее цилиндрических полых структур, приблизительно в 80 Å.

Более точно размеры вирусных частиц [122] определены электронной микроскопией. Диаметр вириона подтипов A₂₂ и O₁ вируса ящура, равен в среднем 24,5 нм. Некоторые различия размеров вируса, установленные в исследованиях разных авторов, могут быть обусловлены методическими особенностями очистки, концентрирования вирусных материалов, условиями хранения, приготовления препаратов для электронной микроскопии, а также ошибками измерения [374].

С помощью различных методов очистки и ультрацентрифугирования в градиентах плотности [176, 182, 183, 362] установлено, что вирус ящура состоит из двух частиц, различающихся между собой морфологически и по функциональным особенностям. Эти данные были подтверждены с помощью реакции диффузионной преципитации [192],

реакции связывания комплемента и путем хроматографии на диэтиламиноэтилцеллюлозе [191].

Одна из этих частиц имеет величину 23-25 миллимикрон и константу седиментации 146 S; обладает свойствами нуклеопротеида, сохраняет антигенные и инфекционные свойства. Эта частица обладает строгой типовой специфичностью в серологических реакциях. Другая частица имеет величину 7 миллимикрон, константу седиментации 12 S, представляет собой белок и не обладает инфекционными свойствами. Эта частица стимулирует образование комплементфиксирующих и преципитирующих антител, но не вызывает образования вируснейтрализующих антител. Она дает реакцию типовой специфичности, но обнаруживает наличие общетипового антигенного компонента [202].

Частицы величиной 7 миллимикрон появляются позже, чем частицы 25 миллимикрон, поэтому можно считать, что первые образуются в результате деградации вторых [209, 210].

Кроме названных двух антигенов, был открыт еще третий антиген с константой седиментации 75 S. Этот антиген обладает комплементсвязывающей и преципитирующей активностью, но лишен инфекционности. В отличие от 140 S антигена, 75 S антиген при взаимодействии кислой рН не распадается на 12 S частицы [63, 189, 224].

Плантерозе и соавторы [362] в процессе размножения вируса ящура обнаружили термолабильный антиген с константой седиментации 65 S. Природа этого антигена, по-видимому, такая же, как и 75 S антигена.

Имеются сообщения о наличии у вируса ящура, так называемого внутреннего антигена [377], который еще недостаточно изучен.

Основным структурным элементом вириона вируса ящура является протомер, состоящий из полипептидов VP₁, VP₂ и VP₃. Протомеры собраны в пентамеры (константа седиментации 12 S); двенадцать таких пентамеров образуют вирусный капсид, внутри которого расположена рибонуклеиновая кислота, тесно связанная с четвертым полипептидом VP₄. В целом, капсид состоит из 60 копий каждого из 4 полипептидов VP₁, VP₂, VP₃ и VP₄. Кроме того, в каждой вирусной частице обнаруживается по 1-2 копии полипептида VP₀ (предшественника VP₂ и VP₄). Предполагают, что вершины икосэдра образуют полипептид VP₁, который легко расщепляется при воздействии на вирионы трипсином [383].

В составе вируса ящура обнаружено 6 видов структурных полипептидов: VP₁, VP₂, VP₃, VP₄, VP₀ и VP_g. По первоначальной оценке, основанной на результатах электрофореза в ДСН-буферной системе, молекулярная масса их была определена соответственно 34000, 30000, 26000, 15000, 39000 и 5000 Д [387]. Отмеченные в дальнейшем вариации в размерах молекулярных масс указанных полипептидов связывались с типовой и подтиповой вариабельностью вируса, с методическими особенностями постановки опытов [374].

В работах последних лет по секвенированию участков генома, кодирующих структурные полипептиды вируса ящура, молекулярные массы их рассчитаны более точно: для VP₁, VP₂ и VP₃ они составляют 23000-24000, для VP₄ – 7400, VP_g – 2400 Д [141, 159, 200, 204, 205, 257, 279, 280, 373].

Мурдин с соавторами [312] предложили эффективный метод выделения коллоидных белков вируса ящура, особенно полипептида VP₁, с помощью хроматофокусирования. Предложенным методом удавалось получить в чистом виде полипептиды VP₁ и VP₂ вируса ящура.

1.3.2 Возбудитель АЧС

Возбудителем АЧС является уникальный ДНК-содержащий вирус, ранее причисленный к семейству *Iridoviridae* из-за морфологического сходства. Ныне он считается более сходным с членами *Roxviridae*, в настоящее время является его единственным членом, асфивирусом (*Asfivirus*), семейства АЧС-подобных вирусов – *Asfarvirioae*. Он выделяется среди ДНК-содержащих вирусов необычным поведением истинного арбовируса, способного размножаться как на позвоночных, так и на беспозвоночных хозяевах. Несмотря на то, что идентифицирован всего лишь один-единственный серотип этого вируса, существуют более 20 его генотипов, а также многочисленные субтипы вируса АЧС, различающиеся по вирулентности.

Вирусная природа возбудителя АЧС была установлена еще на раннем этапе исследований Монтгомери, а затем подтверждена Стенном и Уолкером. После этого предпринимались многочисленные попытки его классификации, однако ни в одном из определителей агент не находил постоянного места. Позже, опытами по изучению действия

идоксиридина на репродукцию вируса АЧС было доказано, что он содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту и является ДНК-содержащим вирусом [142, 276, 294]. Методом электронной микроскопии было установлено, что в пораженных клетках встречаются как полные, так и неполные формы вирионов. В своей полной форме вирион имеет форму многогранника с кубической симметрией и двуслойной оболочкой. Ограниченное оболочкой пространство, заполнено массой нуклеоида округлой формы [177, 178]. Неполные формы вирионов представляют собой округлые образования без заметного внутреннего содержимого. Наличие неполных форм вируса АЧС в пораженных клетках обусловлено различными стадиями репликации вирусных частиц [288]. Так как ряд морфологических признаков возбудителя (форма и симметрия вирионов, их локализация в цитоплазме и др.) был сходен с таковыми у иридовирусов, то изначально вирус АЧС был классифицирован в таксономии вирусов как представитель семейства *Iridoviridae* [221].

Более поздние электронно-микроскопические исследования структуры вируса АЧС показали, что его вирионы представляют собой округлые частицы с икосаэдрической симметрией и протеиновой коровой структурой. Диаметр частиц варьирует от 175 до 215 нм. Ядро вириона имеет около 80 нм в диаметре и состоит из трехслойного капсида, внутри которого располагается плотный нуклеоид, окруженный электронно-прозрачным слоем [197, 198, 232]. Снаружи ядро покрыто двуслойной липопротеиновой оболочкой, которая имеет типичное строение и необходима для проявления инфекционных свойств вируса [311]. Выход вириона из пораженной клетки осуществляется отпочковыванием и через микроворсинки [179]. Оболочка приобретает вирионом в процессе морфогенеза и имеет антигенное сходство с ретикулоэндотелиальными тканями хозяина [152, 153, 376]. Более подробное изучение фенотипических параметров показало, что помимо морфологического сходства с иридовирусами, вирус АЧС обладает также отдельными признаками (структура генома, механизм репликации и др.) характерными для вирусов семейства *Poxviridae* [219, 416]. Это послужило основанием для пересмотра таксономической принадлежности вируса АЧС и выделению его в самостоятельный род отдельного семейства [221].

Морфогенез вируса АЧС представляет собой сложный и комплексный процесс. Несмотря на то, что возбудитель размножается в цитоплазме, для его репродукции

необходимо также и ядро клетки. Процесс репликации начинается в так называемых “вирусных фабриках”, которые представляют собой отдельные перинуклеарные участки клетки [185, 264]. Почти одновременно внутри клетки формируется ядро, окруженное двумя последовательными слоями: внутренним (капсид) и внешним (липопротеиновая оболочка). Внутренний слой ядра почти целиком состоит из структурального белка VP72 (B646L), в то время как внешний формируется из фрагментов, которые образуются при эрозии цистерны ретикулоэндотелиальной ткани хозяина в процессе почкования вириона. В процессе морфогенеза часть этих фрагментов используются так называемыми “вирусными фабриками” для формирования внутреннего слоя ядра [152, 265]. Созревание ядра происходит почти одновременно с формированием (сборкой) капсида, которая обусловлена вирусной цистеин-протеиназой pS273R, при расщеплении которой образуются полипротеины pp220 и pp62. Производные pp220 (p150, p37, p34 и p14) и pp62 (p35 и p15) являются 6-ю основными структуральными белками, формирующими внутренний слой ядра, который занимает пространство между нуклеоидом и липопротеиновой оболочкой [146, 151].

В настоящее время вирус АЧС является единственным представителем рода *Asfivirus* семейства *Asfaviridae* [222]. Посредством филогенетического анализа было установлено, что возбудитель обладает отдельными характеристиками представителей семейств *Iridoviridae*, *Poxviridae*, *Phycodnaviridae* и *Mimiviridae* [275, 276]. Плавающая плотность агента в CsCl составляет 1,19-1,24 г/см³, а коэффициент седиментации 1800-8000 S. Во внутренней структуре вириона выделяют два основных элемента: капсид и нуклеоид. Капсид имеет 172-191 нм в диаметре и состоит из 1892-2172 капсомеров, размещенных друг от друга на расстоянии 7,4-8,1 нм. Капсомер представляет собой гексагональную призму 13 нм в диаметре и с центральным отверстием. Внутри капсида располагается нуклеоид, состоящий из плотных фибрилл, которые содержат ДНК. Последняя представлена двухцепочечной линейной молекулой, размеры которой варьируют от 170 до 190 тыс.н.о., в зависимости от изолята. ДНК состоит из 170 тыс. н.о. длиной 58 нм с ковалентными концевыми сшивками в виде инвертированных повторов величиной 2,7 тыс. н.о. Геном кодирует свыше 100 полипептидов, более 30 из которых обнаруживаются в препаратах очищенного вируса. Согласно имеющимся данным, инфекционностью ДНК вируса АЧС не обладает [104].

Вирус АЧС неоднороден и представляет собой гетерогенную популяцию штаммов, отличающихся по своей вирулентности, признакам гемадсорбции и ряду других свойств. При изучении 40 различных штаммов возбудителя, выделенных в Африке и Европе, было установлено, что антитела, задерживающие гемадсорбцию, обладают специфичностью к определенным штаммам вируса. На основании данного свойства было выделено 7 различных в серологическом отношении типов агента [295]. В дальнейшем данное свойство, антигенная гетерогенность вируса АЧС, было подтверждено с использованием моноклональных антител против структуральных белков культивированного вируса и перекрестным заражением свиней, выживших после введения аттенуированных штаммов [415, 421]. Антигенная вариабельность вируса АЧС позволила разделить его изоляты на 3 группы: А (Lisbon 57, Funchal 65 и Katanga 64), В (Lisbon 60, Madrid 60 и Angola 72) и С (Mosambique 64). С помощью иммунопробы и реакции задержки гемагглютинации, в каждой группе выделено по 7 референс-штаммов [7, 105]. Филогенетический анализ гена В646L, кодирующего один из основных структуральных белков VP72 показал, что в настоящее время семейство *Asfaviridae* представлено 22-мя генотипами вируса АЧС [162, 168, 293].

1.4.Изменчивость антигенных свойств вируса ящура

К наиболее важным особенностям вируса ящура относятся легкость изменения его антигенных и вирулентных свойств в организме как естественно восприимчивых, так и лабораторных животных [225, 273]. Степень мутации некоторых штаммов вируса ящура в сторону температурной резистентности доходит до 10^{-4} , что свидетельствует о непрерывном образовании большого количества новых мутантов [301].

По данным Собзино и соавторами [391], на одну клетку инфицированной культуры ткани почки телят освобождается около 370 бляшкообразующих единиц инфекционности. Таким образом, каждая инфицированная клетка культуры может продуцировать мутант.

Изучение изменчивости биологических свойств вируса ящура проводят в экспериментальных условиях на тканевых культурах в организме лабораторных и естественно восприимчивых животных. Культура ткани, по-видимому, единственная биологическая система, в которой можно количественно изучать наличие и выделение

мутантных форм. К вирусу ящура и тканевой культуре можно применять большое количество селективных стрессов для отделения популяций вируса с измененными характеристиками. В качестве примеров можно привести последовательное пассирование вируса в культуре ткани в присутствии антител, продолжительные серийные пассажи, проживание вируса в хронически инфицированных культурах межпассажное прогревание вируса и пассирование при субоптимальных температурах [57, 148, 175, 374, 391, 392].

Важные сведения об изменчивости вируса ящура получены при пассировании его в тканевых культурах.

Путем длительного пассирования афтозного вируса ящура крупного рогатого скота в культуре клеток почек теленка Михалишин В.В. и соавторы. [78] получили варианты штамма А-98 “Владимир”, которые отличались от родительского штамма антигенными свойствами и морфологией образуемых бляшек.

Небольшое количество пассажей вируса ящура в культуре ткани при оптимальной температуре обычно не изменяют антигенной характеристики вирусной популяции. Так, Бауэр и Витман [164] установили, что чистые линии вируса ящура подтипов О₁, О₂ и О₃, полученные путем клонирования методом бляшек в течение пяти пассажей, нельзя отличить от их родительских штаммов в тестах перекрестной иммунизации.

В классическом эксперименте Аль [145] обнаружил, что при смешанном инфицировании культуры клеток почек крупного рогатого скота 40°С термочувствительными и терморезистентными штаммами вируса ящура типов О, А и С продуцировались гибридные вирионы с термочувствительными геномами и терморезистентными белковыми капсидами. Способность к гибридизации не зависела от типовой принадлежности изучаемых штаммов.

Прингл и Слейд [368] представили количественные данные о генетической рекомбинации между КЗ и PhO-1 штаммами вируса ящура типа Sat-2, которые различались по 6 маркерам. Селекция из клеточных культур, подвергнутых смешанной инфекции, давала небольшое количество рекомбинаций потомства. Данные серонейтрализации родительских штаммов и потомства смешанной инфекции показывают, что рекомбинация происходит чаще, чем это определяется по изменению маркеров.

В ветеринарной литературе имеются несколько сообщений о возможности изменения типовой принадлежности вируса ящура в экспериментальных условиях [148, 306, 358].

Об изменении типовой принадлежности вируса ящура в ходе эпизоотии также имеются сообщения некоторых авторов [116, 155, 213, 300]. Однако, наблюдения, которые были сделаны этими исследователями, трудно доказуемы и многими специалистами подвергается сомнению.

Некоторые авторы [68, 81, 127] считают, что одним из главных факторов, обуславливающих изменчивость вируса ящура в этом случае, является пассирование его через иммунный организм животного. По их мнению, вирус ящура не имеет однородной антигенной структуры и заключает в себя целый комплекс видовых специфических белковых антигенных фракций в том или ином сочетании. Признак этого вируса ящура указывает только на то, что в данный момент исследуемый штамм вируса ящура проявляет свои специфические свойства за счет какой либо одной доминирующей антигенной фракции, а отдельные, находящиеся в наименьшем количестве, себя не проявляют. В зависимости от условий внешней среды это сочетание антигенных фракций вируса ящура может измениться в том или ином направлении.

Специфическая резистентность чувствительных животных имеет очень важную роль в изменчивости вируса ящура. Эта резистентность является составной частью комплекса, называемого “средой”, в которой существуют вирусы и к которой они должны адаптироваться, изменяя свою природу и свои свойства. Отвечая на вопрос какие понятия включает в себя среда, Кременчугская перечисляет физические и химические факторы, а также факторы иммунологического порядка [65].

Много имеется факторов, которых мы еще мало знаем. К таким малоизученным вопросам относятся: биология вируса вне организма животного, возможность существования возбудителя в инапарантной форме в других организмах. Мало мы ещё знаем и о свойствах штаммов вируса ящура, выделенных от животных-вирусоносителей.

Анализ материалов МЭБ в Париже [154] сообщили о появлении заболеваний ящуром типа О, А и Азия-1. В ряде государств установлен ящур 2-3-х типов. Они считают, что

появление вируса типа А в ходе эпизоотии ящура типа О следует рассматривать как обострение латентной инфекции.

Говоря об изменчивости вируса ящура [98] авторы подчеркивают, что практически не существует двух идентичных штаммов вируса, которые могут вызвать одинаковые эпизоотии в различное время.

Российские исследователи [64] показали, что изоляты вируса ящура типа А являются более родственными штамму А Турция/06 и значительно отличаются от производственного штамма вируса ящура А₂₂ №550. Изоляты типа О имеют близкое антигенное родство с производственными штаммами О₁ №1618, О № 1734 Приморский/2000 и О₁ Манисо. Имеется большая опасность заноса вируса ящура штаммов генетических линий А Иран/05 и О PanAsia2 из неблагополучных регионов в Армению. Известно, что некоторые изоляты, отнесенные к новым линиям типа А и О, имеют умеренное или слабое антигенное соответствие с используемыми в настоящее время производственными штаммами и в случае возникновения ящура, обусловленного вирусом этих штаммов, вакцина может оказаться недостаточно эффективной [12, 50, 156, 400, 418].

Остановившись на вопросе о перекрестном иммунитете между типами и подтипами вируса ящура, следует отметить следующее. Животные, переболевшие ящуром, вызванным одним типом вируса, почти полностью восприимчивы к любому другому типу. Для подтипов диапазон различий варьирует, при этом перекрестный иммунитет у реконвалесцентов может быть нарушен новым подтипом в исключительных случаях. С подтиповыми различиями обычно сталкиваются в полевых условиях, когда вакцина не может также надежно защищать против гетерологичного штамма, как против гомологичного. Бруксби [186] считает, что если гомологичная вакцина в прививной дозе содержит 20 защитных доз, то в том же объеме препарата содержится 2, 3 или 4 защитных доз против гетерологичного подтипа. В исключительных случаях вакцина может вовсе не создавать защиты против гетерологичного подтипа.

При изучении антигенных свойств штаммов вируса ящура, особенно при отборе производственных штаммов, необходимо учитывать такой признак, как доминантность.

Доминантность, это способность определенного штамма вируса ящура, используемого для изготовления вакцины, создавать защиту против нескольких подтипов. Такие штаммы в качественном отношении обладают большим числом коиммуногенов с родственными подтипами, а в количественном отношении – большей плотностью иммуногенов [27].

Доминантность отдельные авторы [90, 138] отождествляют с понятием “штамм с широким антигенным спектром”.

Российские авторы [139] предложили оригинальную биоматематическую систему расчета серологического родства и доминантности штаммов, которую они применили при эпизоотических штаммах вируса ящура типа А, выделенных в России в период 1995, 2000, 2004 и 2005 гг.

А.А. Бойко [21] под доминантными свойствами штаммов вируса ящура понимает способность популяции вируса одного типа в эпизоотических условиях на определенной территории вытеснять популяцию другого типа. По мнению некоторых авторов [130], доминантные свойства можно выявить в экспериментальных условиях путём пассирования на культуре клеток ВНК-21/2-17 и лабораторных животных смеси двух типов вируса. Причем, в этом случае большое значение будет иметь количественное соотношение популяций вирусов в смеси.

Несмотря на широкую изменчивость вируса ящура, в природе встречаются штаммы, проявляющие длительное время стабильность своих антигенных свойств.

А.М.Рахманов [95] считает, что крупные эпизоотии, как правило, вызываются вирусами более стабильными во времени, чем штаммы с менее выраженной эпизоотичностью. Варианты вируса О, А и Азия-1 появились в периоды, характеризовавшиеся широким распространением специфического иммунитета у вакцинированных животных. Вот почему эпизоотии, вызванные этими вариантами, носили спорадический характер. Такой период равновесия, характеризующийся своего рода естественной изоляцией очагов, может быть нарушен появлением новых штаммов, занесенных из очень отдаленных территорий.

В ряде государств установлен ящур 2-3-х типов (Китай, Вьетнам, Индия, Иран, Пакистан, Турция, Египет и др.). В странах Восточной Африки выявлен вирус ящура типов О, А, SAT-1, SAT-2. SAT-3. В целом следует отметить тенденцию последних лет к

расширению ареалов ящура типов О, А, Азия-1 и увеличению количества вспышек, вызванных ими [346, 347].

Стабильным во времени оказался и подтип вируса ящура О₁. Однако, в практике борьбы с ящуром отмечали случаи, когда вирус нового типа, занесенный извне в зону с наличием исключительно восприимчивого скота, не получал широкого распространения. В этих случаях, на первый план выступали хорошо организованные общи ветеринарно-санитарные мероприятия и своевременно проведенные меры специфической профилактики. Таким примером может служить эпизоотия типа А-98, Азия-1-2000 и О-2002, зарегистрированная в Армении.

1.5. Клиническая картина и патологоанатомические изменения при ящуре и АЧС

Из сельскохозяйственных животных к ящуре наиболее восприимчив крупный рогатый скот всех пород и возрастных групп, у которого болезнь чаще всего протекает с наиболее выраженными симптомами. Различают типичную и атипичную (злокачественная, абортивная и латентная) формы ящура. Основные признаки типичной формы: лихорадка, слюнотечение, снижение аппетита и угнетение, хромота, образование афт на слизистой оболочке ротовой полости, на коже конечностей, в области венчика и межкопытцевой щели, на вымени, развитие пододерматита [85]. При злокачественной форме, которая чаще наблюдается у молодняка, кроме афтозных поражений (а иногда и без них), отмечают сильное угнетение, учащение пульса и дыхания, судороги, неестественные позы и т.п. [33]. Для этой формы характерны очаговые воспалительно-некротические изменения в сердце (миокардит) и в скелетных мышцах (бедренных, плечевых, спинных).

Смерть взрослых животных наступает через 5-14 суток, молодняка – через 1-2 суток. Среди свиней заболевание протекает остро, с высокой смертностью молодняка. У свиней поражаются, в основном, конечности, они хромают, иногда наблюдают падение копытцев. Афты также появляются на пяточке, молочных железах, реже в ротовой полости. У взрослых свиней заболевание длится 8-25 суток [111, 195]. У поросят ящур протекает в септической форме и в первые дни вызывает гибель 60-100% животных. При тяжелом течении ящура

наблюдают кровоизлияния в слизистых оболочках пищеварительного тракта, в легких и почках, под серозными оболочками [16].

У хорьков кроме обычных клинических признаков появляются афты на коже мошонки и снижается половая активность [17]. Картина вскрытия может различаться в зависимости от возраста животных и распространения инфекционного процесса, различных осложнений.

У овец и коз ящур протекает менее остро, чем у крупного рогатого скота. У них редко отмечают слюнотечение. Афты у овец и коз мелкие, рано вскрываются, а возникшие на их месте эрозии при отсутствии осложнений быстро заживают [118]. У коз нередко по всей поверхности слизистой оболочки ротовой полости возникают афты величиной с горошину, затем на их месте остаются ярко-красные эрозии с ровными краями (эрозийный стоматит). Для ящура мелких жвачных наиболее характерный признак – хромота в связи с поражением конечностей (афты в области межкопытцевой щели и венчика, а также пододермататы)

При массовом распространении ящура в отаре у части животных обнаруживают весь характерный для болезни симптомокомплекс: афтозно-эрозийные изменения на губах, языке, деснах, беззубом крае верхней челюсти, на конечностях и вымени, повышение температуры тела (до 41,5°C), снижение аппетита, периодическое прекращение жвачки, угнетение. Нередко у овец ящур протекает со слабыми признаками или вообще при их отсутствии, поэтому остается недиагностируемым. Овцы в таких случаях могут оставаться вирусоносителями в течение нескольких месяцев и играть роль скрытого источника вируса. У ягнят ящур чаще проявляется в форме септицемии и сопровождается большим отходом. Козы более резистентны к ящуру, однако иногда и у них он протекает злокачественно [33, 118].

При постановке диагноза на ящур учитывают эпизоотологические данные, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения и, обязательно, результаты лабораторных исследований.

Патогенетические процессы при АЧС отличаются ярко выраженной двойственностью характера, которая обусловлена особенностями, как ее возбудителя, так и его хозяев. Известно, что у диких африканских свиней заболевание протекает без видимых клинических признаков и поражений внутренних органов [211]. Некоторые исследователи

считают, что данное явление обусловлено выраженным тропизмом вируса, который, после локализуется и размножается преимущественно в клетках тканей селезенки и лимфатических узлов этих животных [268, 367]. По мнению других исследователей, явление может быть связано низким уровнем репликации возбудителя в лимфоидных клетках и иммунным ответом организма на его внедрение [424]. Установлено, что размножение агента в тканях селезенки и лимфатических узлах сопровождается апоптозом лимфоцитов различных клеток. Наивысшая степень апоптоза была отмечена в В-клетках лимфатических узлов через 10 дней после заражения животных. Предполагается, что в процессе эволюции организм диких африканских свиней приспособился регулировать процессы как локализации, так и репликации вируса, поддерживая апоптоз лимфоидных клеток на уровне, который дает возможность переболеть АЧС без видимой патологии [351, 352, 385].

В отличие от африканских диких свиней, в организме свиней культурных пород и диких кабанов, патогенетические процессы АЧС сопровождаются целым рядом физиологических и патоморфологических изменений. После проникновения в организм, вирус поражает ретикулярные клетки, моноциты и макрофаги мононуклеарной фагоцитарной системы, которые считаются местами его первичной репликации *in vivo* [55, 185, 206, 296]. Дезинтегрировавшая нуклеиновая кислота вирусных частиц индуцирует перестройку клеточного метаболизма, в результате чего подавляется синтез клеточного белка и активизируются гидрологические ферменты. Активизация ферментов приводит к перегрузке ферментативных систем и цитопатогенному процессу, который заканчивается гибелью клетки. Процесс репликации и выхода возбудителя из клеток сопровождается некрозом эндотелиальных и ретикулярных клеток, макрофагов, массивным апоптозом лимфоцитов и дезорганизацией соединительнотканых структур [278]. Локализация вируса АЧС в клетках тканей органов домашних свиней и диких кабанов не отличается тропизмом. Так, уже через сутки после экспериментального заражения возбудитель может быть выявлен в клетках их селезенки, легких, печени и костного мозга с помощью лабораторных методов прямого обнаружения [207].

У домашних свиней и диких кабанов АЧС может протекать сверхостро, остро, подостро и хронически. При сверхостром и остром течении заболевания вирус разрушает клетки

лимфоидных органов, угнетая иммунную систему, а при подостром и хроническом течении нарушается соотношение субпопуляций лейкоцитов, функции макрофагов и синтез медиаторов клеточного иммунитета [60, 104, 278]. Во всех случаях развитие процесса приводит к необратимым патофизиологическим изменениям и развитию иммунодефицита [230, 363]. Последний обусловлен цитопатическим эффектом, который оказывает возбудитель на пролиферирующие клетки ретикулоэндотелиальной системы в процессе своего размножения [150]. При естественном заражении животных, первичная репликация агента происходит в бронхиальных, печеночных и мезентериальных лимфатических узлах. После первичной репликации, вирус проникает в кровь и посредством кровотока быстро распространяется по всему организму. При заражении негемадсорбирующими штаммами, распространение возбудителя происходит за счет эритроцитов, которые адсорбируют больше 90% циклирующих вирусных частиц. В отличие от бородавочников, содержание агента в крови домашних свиней и диких кабанов может быть высоким, достигая до 10^8 ГАД₅₀/мл [367].

Распространение вируса АЧС в организме домашних свиней и диких кабанов сопровождается его воздействием на лимфоидную ткань, костный мозг и кровеносные сосуды. Это проявляется в мукоидном набухании и фибриноидном некрозе сосудистых стенок и апоптозе лимфоцитов, макрофагов и мегакариоцитов, которые ведут к так называемой “эндотелиальной смерти” [196, 268, 370]. При остром и подостром течении патогенетический процесс характеризуется расстройством гемодинамики лимфоидных органов (лимфатических узлов, селезенки и тимуса), изменением картины крови (лейкопения, повышение склеиваемости лейкоцитов, активизация ферментов), нарушением проницаемости сосудистых стенок, активацией фосфатаз и исчезновением гликогена в печени. Патогенетический процесс усугубляется развитием гиперэргических реакций, которые приводят к поражению центральной нервной системы и различным воспалительно-дистрофическим изменениям в паренхиматозных органах. При хроническом течении инфекции наблюдается проявление аллергических реакций, переходящих в аутоиммунную болезнь с поражением органов – мишеней респираторной системы (лимфатических узлов и легких). В период рецидивов болезни выявляют циклические изменения в картине белой крови, аутоиммунное повреждение нейтрофилов и угнетение фагоцитарной активности [104].

При сверхостром течении АЧС домашние свиньи и дикие кабаны могут погибать без видимых клинических признаков [266, 354]. Наиболее характерно острое течение инфекции, при котором животные погибают в течении 6-12 дней. На начальной стадии болезни у свиней отмечается гипертермия (40.5-42°C) и изменения в картине крови (лейкопения и тромбоцитопения в течение 48-72 часов). Стадия полного симптомокомплекса характеризуется общим угнетением, отдышкой и парезом задних конечностей. На коже ушей, шеи, дистальной части промежностей и вентральной части брюха появляются красно-фиолетовые пятна. В отдельных случаях может наблюдаться рвота и диарея (иногда с кровью), а у супоросных свиноматок – аборт [104]. За 24-48 часов до гибели у животных понижается температура и развивается цианоз кожи. Летальность часто достигает до 100%. Клиника подострой формы АЧС сходна с таковой при классической чуме свиней. Летальность может варьировать от 30 до 70%, однако в большинстве случаев болезнь длится 30-45 дней и заканчивается выздоровлением животных. При хроническом течении АЧС у животных наблюдается истощение, нерегулярные скачки температуры и хромота, вызванная артритами (иногда некротическими). Заболевание длится от 2 до 5 месяцев и характеризуется сравнительно низкой (меньше 30%) летальностью [355]. Среди домашних свиней высокий процент летальности от АЧС обусловлен неспособностью их организма к выработке антител, обладающих превентивной активностью [399].

В организме инфицированных животных могут быть выявлены преципитирующие, связывающие комплемент и задерживающие гемадсорбацию антитела, однако обнаружить вируснейтрализующие антитела никому не удавалось. Переболевшие АЧС домашние свиньи могут переносить экспериментальную инфекцию, вызванную гомологичным штаммом вируса, однако введение гетерологичного штамма вызывает у них острое течение заболевания и падеж [295]. Отсутствие вируснейтрализующих антител рассматривается в качестве главного препятствия при разработке средств специфической профилактики АЧС. Надежных препаратов иммунизации против АЧС в настоящее время пока не существует [203, 220, 289]. Попытки защитить поголовье свиней с помощью инактивированной вакцины также закончились безуспешно. Большинство вакцинированных животных погибало при контрольном заражении, а выжившие животные переболели в течение длительного

периода. Вакцины из живого аттенуированного вируса защищали от заражения гомологичным штаммом 50-90% вакцинированного поголовья домашних свиней, однако у животных развивались различные поствакцинальные осложнения, после чего они длительное время оставались носителями вируса [105].

1.6. Диагностика и культивирование вирусов ящура и АЧС

Для успешного выделения вируса необходимо располагать достаточным количеством свежего патматериала, иметь в наличии восприимчивых к вирусу сельскохозяйственных или лабораторных животных, а также чувствительные к вирусу культуры тканей; располагать условиями, исключающими возможность выноса вируса за пределы диагностической лаборатории.

Для лабораторного исследования ящура отбирают патологический материал в виде стенки и содержимое свежих афт (лимфу), пробы крови в момент лихорадки у животных, лимфатические узлы области головы, пищеводно-глоточную слизь и пробы сывороток крови (не ранее 14 суток после появления клинических признаков) [1, 25].

Для прижизненного обнаружения вируса ящура можно использовать слюну [29, 53, 86, 102, 134] и кровь больных животных [112, 133]. При исследовании на вирусоносительство у животных при жизни специальным зондом отбирают пищеводноглоточную жидкость [292, 313, 357].

При отборе, доставке и исследовании патматериала должны быть созданы условия, исключающие рассеивание вируса и вынос его за пределы диагностической лаборатории. Для выявления вируса ящура в патологическом материале применяют РСК, ИФА и ПЦР.

Выделение вируса с использованием культур клеток, РСК, ИФА и ПЦР позволяет обнаруживать вирус и одновременно определять серотип [16, 48, 54, 129, 134, 138, 139, 140].

При выделении вируса из других органов и тканей животных обычно используют центрифугат суспензии 1:5-1:10 на физиологическом или фосфатно-буферном растворе с добавлением антибиотиков. Эффективность выделения вируса из патологического материала значительно повышается при использовании методов очистки и концентрирования вирусосодержащей суспензии [35, 59, 77, 103, 408].

Лучшим, хотя и дорогостоящим методом прямого обнаружения вируса ящура в патологическом материале, является биопроба на крупном рогатом скоте [34, 127, 283].

Для индикации вируса ящура этот метод применяли многие исследователи [149, 401, 48]. Для обнаружения вируса ящура в поражениях языка и носогубного зеркала буйволов применяли метод интердермолингвального введения материала буйволам в возрасте до 1 года.

Некоторые авторы при выделении вируса ящура с положительными результатами использовали подсвинков 12 недельного возраста или новорожденных ягнят [132, 149]. Многочисленными авторами [40, 42, 49] для выделения вируса ящура использовалась биопроба на морских свинках. Морские свинки являются значительно менее чувствительными к вирусу ящура, чем крупный рогатый скот. Основным недостатком этого метода индикации является то, что требуется значительное время для адаптации вируса и получения окончательного результата. В этом отношении биологическая проба на мышах-сосунах выгодно отличается от метода инокуляции морских свинок [372].

По данным Сюрин В.Н и соавт. [119] ИД₅₀ вируса, установленные на крупном рогатом скоте и мышах-сосунах одинаковы. Основным недостатком этого метода выделения вируса является частые случаи неспецифической гибели животных [30].

Высококочувствительным методом выделения вируса считается инокуляция тканевых культур. Применяют как однослойные, так и суспензионные клеточные культуры, однако первые являются более приемлемыми. Исследования [110] показали, что по своей чувствительности однослойные клеточные культуры не уступают крупному рогатому скоту.

Наиболее часто для выделения вируса используют однослойные клеточные культуры почек телят и почек поросят [47, 93, 109, 132, 157, 257].

При выделении вируса ящура от реконвалесцентов в сравнительном аспекте [166] изучали чувствительность различных культур тканей: монослойной культуры БП, культуры клеток БП в виде суспензии во флаконах с агаром (метод Купера) и монослойную культуру клеток ВНК-21. Наиболее чувствительной системой оказалась культура клеток почек теленка в виде суспензии на агаровой среде. В литературе имеются сообщения о пригодности клеток ВНК-21 для обнаружения вируса ящура в пищеводно-глоточной жидкости переболевших ящуром животных [194, 403, 404].

Для культивирования вируса ящура успешно применяется перевиваемая линия клеток ВНК-21/13, активно размножающаяся как в монослое, так и в суспензии [79, 89, 120, 130, 157]. Обладая высокой чувствительностью к вирусу ящура, эти клетки обеспечивают получение высокоактивного вирусного сырья с выраженными антигенными и иммуногенными свойствами [8, 20, 36, 44, 45, 69, 117, 167, 305].

Сутмоллер и соавт. [402] получили положительные результаты при выделении вируса ящура от реконвалесцентов, используя однослойную культуру БП, выращенную в 5-литровых матрасах Повитской.

По данным некоторых авторов [187, 390] наиболее чувствительной системой для выделения вируса ящура от реконвалесцентов являются клетки щитовидной железы телят.

Отрицательным моментом в использовании метода инокуляции тканевых культур является тот факт, что некоторые штаммы вируса ящура при прямом культивировании не проявляют цитопатогенного эффекта. Поэтому возникает необходимость проведения серийного пассирования вируса и подтверждения его наличия в культуре ткани биопробами на лабораторных животных и исследованиями в РСК [134].

В настоящее время получаемые в ходе ПЦР ДНК-копии гена VP₁ вируса ящура подвергаются нуклеотидному секвенированию [66, 138, 281]. Филогенетический анализ установленных таким образом нуклеотидных последовательностей гена VP₁ позволяет определять происхождение вируса, вызвавшего вспышку заболевания и установить возможный источник инфекции. Результаты таких исследований свидетельствовали о том, что вспышки ящура, имевшие место на территории Армении в 1998, 2000, 2002, 2007 годах, были вызваны заносом возбудителя инфекции из Турции.

Для выявления антител к вирусу ящура в сыворотках крови применяют реакцию нейтрализации и ИФА. Реакция нейтрализации признана МЭБ и ФАО в качестве стандартной для выявления антител к вирусу ящура, однако она не позволяет дифференцировать поствакцинальные и постинфекционные антитела [15, 53, 112, 133, 161, 383].

Методом генной инженерии в ФГУ «ВНИИЗЖ» получены рекомбинантные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура и на их основе разработаны диагностические тест-системы для

выявления антител к неструктурным белкам вируса, позволяющие дифференцировать поствакцинальные и постинфекционные антитела[53, 161, 383].

Во ВНИИЗЖ, помимо традиционных методов диагностики ящура (изоляция ВЯ в культурах клеток, РСК, ИФА), с начала 1990-х годов применяют обратнотранскриптазную ПЦР, позволяющую обнаруживать и типировать ВЯ, а в сочетании с нуклеотидным секвенированием – проводить филогенетический анализ выявленного вируса и определять его происхождение. В последние годы для диагностики вирусных болезней начали применять ПЦР-РВ [136, 137, 139, 409].

Метод сочетает в себе достоинства классической ПЦР (высокую чувствительность, специфичность, быстроту получения результатов) с рядом преимуществ. Регистрация результатов реакции в режиме реального времени позволяет отказаться от электрофореza продуктов ПЦР, что сокращает продолжительность анализа и уменьшает вероятность ложноположительных результатов из-за контаминации исследуемых проб продуктами амплификации. Кроме того, ПЦР-РВ обеспечивает не только качественный, но и количественный анализы[264]..

Ввиду отсутствия средств специфической профилактики АЧС, первыми мероприятиями, направленными на предотвращение заноса и распространения этого заболевания в настоящее время продолжают оставаться его отслеживание, раннее выявление и быстрая диагностика [144, 269, 282, 325, 386]. Диагностируют инфекцию комплексно, на основании результатов клинических, патологоанатомических и лабораторных исследований. При клиническом обследовании основанием для подозрения на АЧС может служить характер проявлений недомогания, а также корреляция между началом гипертермической реакции, полным симптомокомплексом, снижением температуры и падежом животных [3, 240]. В отдельных случаях характерные патологоанатомические изменения во внутренних органах могут служить основанием для постановки предварительного диагноза. По некоторым данным, вскрытие в полевых условиях позволяло выявить до 80 % случаев АЧС [354]. Патогномичной при АЧС патологоанатомической картиной считается совокупность: геморрагической спленоmegалии селезенки, геморрагического лимфаденита, точечных и полосчатых кровоизлияний в сердечных мышцах, серозно-геморрагического нефрита,

серозно-фибринозного отека легких, геморрагического холецистита и скопления серозно-фибринозного экссудата в грудной, брюшной и перикардиальной полостях [60].

Так как характер патологических признаков при АЧС варьирует в зависимости от различных факторов (возраст свиней, продолжительность болезни, вирулентность вируса и т.д.), то уже на раннем этапе исследований окончательный диагноз ставится на основании результатов лабораторных исследований. Одним из наиболее надежных методов лабораторной диагностики АЧС является реакция гемадсорбции, позволяющая выделить ее вирус из патологического материала [76, 170, 296]. Метод применялся в различных модификациях с использованием первичных культур лейкоцитов крови и макрофагов костного мозга свиней-доноров [220, 289, 399]. Идентификацию возбудителя проводится при помощи реакций преципитации в агаровом геле, а также прямой или непрямой иммунофлюоресценции, комбинированное применение которых позволяет выявить как острую, так и хроническую формы инфекции [171, 174, 175, 203, 386, 420]. Ввиду сходства клинических признаков и патологоанатомических изменений с таковыми при КЧС, дифференциальная диагностика АЧС проводилась также при помощи метода перекрестного иммунитета. Последний получил широкое применение в европейских странах (Англия, Франция), где особое значение придавалось использованию животных гипериммунных к КЧС [61, 72].

В период с 1970 по 1990 гг. параллельно с совершенствованием классических методов диагностики АЧС (РГАД, РПИФ и др.) разрабатывались новые методы ее раннего выявления. Наиболее эффективными в этом отношении оказались иммуно-ферментный анализ и иммуноблоттинг, комбинированное применение которых позволяло выявить вирусспецифические антитела и идентифицировать вирусный антиген при жизни животных [158, 171, 174, 353, 420]. Преимущество этих методов заключается в возможности проведения скринингового обследования поголовья и выявления различных форм инфекции в инкубационном периоде, что позволяет предотвратить ее дальнейшее распространение на раннем этапе [158, 231]. В 90-ых годах были разработаны методы генной диагностики, одной из которых является полимеразно-цепная реакция, основанная на увеличении фрагментов ДНК вируса в патологическом материале с помощью комплементарных им коротких

фрагментов нуклеиновой кислоты [219, 398]. В последующие годы справочными лабораториями МЭБ и других специализированных лабораторий наряду с ГИДР начали применяться также молекулярную гибридизацию и геномную дактилоскопию, которые направлены на филогенетическое изучение свойств генома возбудителя [70, 107].

Все описанные методы лабораторной диагностики АЧС рекомендованы МЭБ в различных модификациях [107, 321]. В Европейском Союзе некоторые из этих методов (РГАД, РПИФ, ИФА и ПЦР) были утверждены в качестве стандартного комплекса исследований для окончательной диагностики заболевания [238]. В справочных лабораториях наиболее широкое применение нашла РГАД, так как она позволяла выявить широкий диапазон известных штаммов и изолятов возбудителя в организме инфицированных животных, как в период клинического проявления болезни, так и в инкубационном периоде. На территории Российской Федерации в качестве стандарта для лабораторной диагностики АЧС была утверждена другая схема (РГАД, РПИФ, РНПИФ, ИФА и биопроба) [76], однако окончательный диагноз устанавливается только при совпадении результатов РГАД и РПИФ с результатами ПЦР [144, 269, 282]. Следует отметить, что приведенные схемы диагностических исследований эффективны только в случае раннего применения при подозрении на инфекцию. Мировой опыт борьбы с АЧС показывает, что в странах, где диагностика заболевания по тем или иным причинам выполнялась с опозданием, болезнь быстро распространялась и приводила к тяжелым социально-экономическим последствиям [147, 215].

До 1960 года реакции для обнаружения вируса АЧС не были разработаны. В 1960 г. Malmquist W. A., Hay D. [296] показали, что вирус при заражении культур лейкоцитов или клеток костного мозга свиньи вызывает адсорбцию эритроцитов подобно реакции, описанной Фогелем и Щелоковым в 1957 г. для вируса инфлюэнцы. Следует подчеркнуть, что это свойство вируса АЧС специфично, так как ни при одном другом остром эпизоотическом заболевании свиней гемадсорбции не обнаруживали [238, 275]. Сомнения отдельных исследователей [178, 229] в специфичности этого феномена в настоящее время представляются необоснованными.

Гемадсорбция характеризуется “коронай” сжатых эритроцитов, расположенных беспорядочно друг над другом, так что они нередко закрывают всю клетку, придавая ей вид зрелой ягоды малины. В дальнейшем эта корона из эритроцитов становится более рыхлой. В случае неспецифической гемадсорбции образуется более широкая корона, эритроциты в ней расположены более упорядоченно. В свободных пространствах между клетками появляются кучки эритроцитов. Такое явление наблюдают чаще в молодых культурах, оно нестойко и исчезает после встряхивания пробирки. При специфической гемадсорбции лейкоциты при встряхивании не исчезают. Гемагглютинирующими свойствами вирус не обладает [229, 296].

Гемадсорбцию изучали электронномикроскопически, но окончательно механизм реакции не расшифровали [296]. Установили наличие узкой электронноплотной зоны между некоторыми эритроцитами и инфицированным лейкоцитом. В большинстве комплексов гемадсорбции вирусных мостиков не наблюдали [229].

За гемадсорбцией обычно следует цитолиз, приводящий к постепенному разрушению культуры. Основными цитоплазматическими изменениями в зараженных клетках являются распад хроматина ядра клетки, появление вакуолей в цитоплазме и образование внутрицитоплазматических телец-включений [250], которые выявляются после окрашивания по Гимза. Включения (величиной около 5 нм) ацидофильны, хорошо видны также после окрашивания акридином оранжевым, что указывает на наличие в них ДНК. Изменяется и ядро, в нем уплотняется хроматин, образуются зерна, которые нагромождаются друг на друга и локализуются вдоль мембраны [174, 251].

В опытах по изучению размножения вируса АЧС методами гемадсорбции и автордиографии установили, что синтез вирусной ДНК начинается в период между 6-м и 7-м часами после инокуляции и заканчивается в основном через 10-12 часов [74, 236]. В это время впервые обнаруживают вновь сформированные инфекционные вирусные частицы [250]. Гемадсорбцию также наблюдают в некоторых клетках между 8-м и 10-м часами после инокуляции, но в большинстве случаев – через 24-48 часов; при использовании небольших доз вируса – только через 72 часа. Максимальный титр (10^7 ГАЕ₅₀/мл) регистрируют спустя 36-72 часа после инокуляции. Цитопатогенное действие, оцениваемое по уменьшению количества прикрепленных клеток при сравнении с

неинфицированными, контрольными культурами, становится выраженным приблизительно через 24 часа после появления адсорбции. Для титрования вируса, кроме гемадсорбции разработаны методы микрогемадсорбции на пластинках обычных бляшек, и методы иммунофлуоресценции и иммунопероксидазы [296].

Вирус можно культивировать в различных перевиваемых клеточных линиях, но и при этом необходим период адаптации. Чаще всего используют клетки почек свиньи. Применяют также фибробласты куриного эмбриона [310, 311]. В опытах изучена чувствительность к вирусу первичных и перевиваемых культур клеток различного происхождения. Установлено, что для его выделения они менее пригодны, чем клетки лейкоцитов и костного мозга свиней. Хотя опубликованы отдельные сообщения о большей чувствительности моноцитов, они полностью разрушаются в 2-3 дня. Первичные культуры, приготовленные из других тканей свиней, могут обеспечить лишь незначительную скорость размножения вируса. После нескольких пассажей он или исчезает, или нуждается в длительном периоде адаптации, прежде чем начинает репродуцироваться с регулярным проявлением ЦПД [321].

Кроме выделения и титрования вируса, культуры клеток используют и для модификации возбудителя. Некоторые штаммы возбудителя АЧС аттенуированы пассированием в культурах лейкоцитов и костного мозга свиней. В результате 60-кратного пассирования вируса через 5-дневные интервалы у некоторых штаммов снизилась вирулентность и они были применены для изготовления вакцин в Португалии и Испании [239, 237].

Опубликованы данные о выделении негемадсорбирующих штаммов из гемадсорбирующих, методом предельных разведений [197]. В опыте выделили негемадсорбирующие, менее вирулентные штаммы из легких свиней при хронической пневмонии в Португалии. При пассировании их в культуре клеток не менее 50 раз и заражении свиней гемадсорбция не восстанавливалась. В ЮАР выделили негемадсорбирующий штамм от домашних свиней при естественной эпизоотии [272]. Позднее там был выделен негемадсорбирующий вариант из суспензий клещей *O. moubata*, собранных в очагах инфекции. Так как специфическая гемадсорбция характеризует вирулентность штаммов АЧС, выделение менее вирулентных негемадсорбирующих вирусов от свиней с хронической пневмонией представляет большой

интерес. Существует несколько гипотез для объяснения появления негемадсорбирующих штаммов. Одни исследователи считают, что в природе существуют смешанные популяции негемадсорбирующих и гемадсорбирующих частиц, которые в процессе селекции дифференцируются, другие – что негемадсорбирующие штаммы являются мутантами вирулентных гемадсорбирующих штаммов [178, 229].

1.7. Технология изготовления инактивированной противоящурной вакцины

В практике отечественной и мировой биопромышленности противоящурная вакцина производится из инактивированного вируса, выращенного в суспензии клеток ВНК-21 с использованием реакторов емкостью до двух тонн. В связи с плюрализмом вируса ящюра – наличием 7 типов (А, О, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2 и SAT-3), вакцины производятся моновалентными и поливалентными [39, 323].

В зависимости от используемых адъювантов вакцины подразделяются на сорбированные и эмульсионные. В сорбированных препаратах в качестве адъюванта используется гель гидроокиси алюминия, а в эмульсионных – масляный адъювант, состоящий из минерального масла и эмульгатора. Последние готовятся в виде эмульсий типа “вода-масло” или множественной - “вода-масло-вода”. Кроме того, иммуногенность вакцин повышается при добавлении растительного адъюванта – сапонина [77].

Общие требования к производству и качеству вакцин изложены в международных и национальных документах. Международные требования представлены в руководстве МЭБ по наземным животным, Европейской фармакопее и Директивах Европейского союза [39, 208, 233, 323].

Исходный вакцинный вирус после проведения всех исследований на типовую и вариантную принадлежность, определения антигенных и иммуногенных свойств служит источником посевного материала. Рабочий посевной материал готовится посредством субкультивирования, но не более чем в 10 пассажах. Критерием, ограничивающим число пассажей, является его генетическая стабильность. Вирус следует контролировать на контаминацию. Чистоту определяют путем тестирования на отсутствие посторонних

бактерий, вирусов, грибов и микоплазм [9, 21,39, 131].

Вакцинный вирус хранится в замороженном или сухом состоянии при температуре -40°C или -70°C .

Для производства вакцин наиболее удобными являются перевиваемые клетки. Они неприхотливы к питательной среде, из них можно создать банк клеток и получить биомассу в большом объеме. Клетки характеризуются по следующим показателям: история линии клеток, кариологическая характеристика, свобода от посторонних бактерий, вирусов, грибов и микоплазм [10, 319, 401].

Особое внимание при культивировании клеток и вируса уделяется биологическим добавкам (трипсин, сыворотка). Они используются только из тех территорий, которые свободны от прионных заболеваний. При испытании клеток и вируса на чистоту обращают внимание на отсутствие пестивирусов в сыворотке и других ингредиентах, происходящих от крупного рогатого скота [20, 22].

Требования к производству вакцин. Современное производство вакцин зависит от уровня используемой технологии, разработка которой включает: изучение антигенной и генетической структуры вируса, применение новых способов очистки, концентрирования и инактивации, поиски путей повышения иммуногенности вакцин, конструирование новых препаратов [35, 39].

Основными этапами в разработке технологии получения вакцин являются:

1. Изучение и характеристика исходного штамма.
2. Культивирование клеток и вируса.
3. Инактивация вируса, очистка и концентрирование антигена.
4. Составление вакцин (сорбированных и эмульсионных, моновалентных и поливалентных).
5. Розлив, фасовка, маркировка продукции.
6. Упаковка и хранение вакцины.

Показатели качества вакцин. Общие требования касаются безопасности и специфической активности вакцин.

Основными требованиями к специфической безопасности вакцин являются полнота

инактивации вируса и отсутствие остаточной вирулентности. Полнота инактивации вируса ящура достигнута только при использовании препаратов этиленimina, а формолвакцины обладали остаточной вирулентностью как при контроле на КРС при интрадермоингвальном методе введения вакцины, так и при контроле антигена на культуре клеток или новорожденных мышатах [123].

Вакцина должна быть безвредной, т.е. в тест-дозе не должна вызывать изменения клинического состояния здоровья животных. В связи с наличием в вакцине консервантов и адъювантов не должна вызывать видимых изменений тканей в месте введения животным, а также общего отрицательного воздействия на организм (реактогенность).

Препараты клеток, вируса и готовая вакцина должны быть стерильными. Полное отсутствие живой микрофлоры проводят по ГОСТ 28085-89 “Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности” [22].

Специфическая активность вакцины в первую очередь зависит от количества антигена в единице объема (мкг/мл 146 S-компонента). Активность вакцины определяется при помощи статистически достоверного исследования на иммунизированных животных с последующим заражением разрешающей дозой (10^4 ИД₅₀) гомологичного вируса [63].

При активной иммунизации определяется: антигенность, иммуногенность, протективность препарата. Антигенность вакцины характеризуется титром антител, определяемым в реакции серонейтрализации или в иммуноферментном анализе. Защитный титр антител крови в РН составляет 1,5 lg, а в ИФА – 2,0 lg [37, 41].

Иммуногенность вакцины определяется при ее титрации и характеризуется минимальной дозой, обеспечивающей защиту 50% привитых животных (ИмД₅₀/мл).

Протективность вакцины характеризуется количеством ИмД₅₀/мл в прививном объеме, обеспечивающем развитие полноценного иммунитета. В соответствии с международными требованиями протективность вакцины должна составлять не менее 3 защитных доз (<3,0 ПД₅₀). Для быстрой защиты рекомендуются препараты, содержащие не менее 6,0 ПД₅₀. Вместе с тем, установлено, что напряженность и длительность иммунитета у животных, привитых вакцинами, содержащими <3,0 или 6,0 ПД₅₀, не имеет существенного различия, а для быстрой защиты и создания напряженного иммунитета необходимы вакцины с более

высокой протективной активностью. Иммунологические требования к вакцине включают также специфичность, т.е. антигенную идентичность используемого типового штамма вируса. Иммунитет, создаваемый вакциной, подразделяется на:

- полноценный, биологический, когда при контрольном заражении вакцинированных животных вирус не взаимодействует с чувствительными клетками и не размножается;
- клинический, характеризуется снижением специфической защиты и образованием первичных афт при контрольном заражении вакцинированных животных, при отсутствии генерализации;
- полное отсутствие иммунитета характеризуется образованием афт после интрадермолингвального (внутрикожного) заражения и генерализацией процесса.

При изготовлении поливалентных вакцин установлено, что нет интерференции между отдельными компонентами, т.е. антиген одного типа не вызывает снижения защитного иммунного ответа на другой компонент [77, 101, 108, 214].

1.8 Средства специфической профилактики ящура

Необходимо отметить, что вспышки последних лет в большинстве своем обусловлены антигенно измененными штаммами вируса ящура, в связи с чем очень актуальным является оперативное выделение и изучение антигенного и генетического соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам, используемым для изготовления вакцин. При этом следует учитывать и тот факт, что полные сведения о штаммах, циркулирующих в Азии и Африке, трудно получить, так как страны, где ящур является эндемичным, сообщают не обо всех вспышках, и многие случаи остаются вообще не типированными [331].

Российская Федерация после ликвидации двух ящурных очагов типа Азия-1, возникших в 2006г. в Читинской и Амурской областях, с мая 2006г. являлась благополучной страной, осуществляющей зональную вакцинацию. Однако в июле и августе 2010г. в Забайкальском крае (бывшая Читинская область) зарегистрированы 2 вспышки ящура типа О с заболеванием КРС и свиней [331, 343, 344].

Благодаря оперативной диагностике и принятым мерам (введение карантина,

ограничений на перемещение животных, убой, вакцинация, скрининг, дезинфекция помещений и инвентаря) заболевание было успешно ликвидировано в первичных очагах [98].

Республики Беларусь, Молдова, а также Украина и государства Балтии в течение многих лет являются странами, благополучными по ящуру без осуществления вакцинации. Остальные государства СНГ вакцинируют животных против ящура с профилактической целью в различных масштабах, зависящих от их эпизоотической ситуации и финансовых возможностей [99].

Постоянная напряженная эпизоотическая ситуация в мире диктует необходимость координации мер по профилактике и борьбе с ящуром между различными государствами, в том числе и странами СНГ. С учетом этого большое внимание проблеме ящура уделяет созданный после распада СССР Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ, на заседаниях которого систематически обсуждаются вопросы по выработке согласованных действий в осуществлении противоящурных мероприятий на постсоветском пространстве. По поручению Совета ФГУ “ВНИИЗЖ”, имеющего международный статус Региональной референтной лаборатории МЭБ по ящуру для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья, при участии Департамента ветеринарии Минсельхоза России, Россельхознадзора и ветеринарных служб других стран СНГ в 2003г. разработал “Программу совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах Содружества на период до 2010г.”, которая после длительных обсуждений и согласований, внесения дополнений и уточнений 16 апреля 2004г. была утверждена решением Совета глав правительств СНГ (г. Чолпон-Ата, Киргизия).

Следует напомнить, что в годы, предшествующие принятию Программы, во многих странах СНГ систематически отмечался ящур. Так, например, в 1996-2002гг. неблагополучными по ящуру были 8 стран: Азербайджан (1996, 2001 гг.), Армения (1996, 1998 гг.), Грузия (1996-2001 гг.), Казахстан (1996, 1998-2001 гг.), Киргизия (1996-1999, 2001 гг.), Таджикистан (1997, 2000 гг.), Туркменистан (1997, 1999 гг.) и Россия (2000 г.).

В связи с этим основными целями Программы было обеспечение благополучия по ящуру каждого государства и Содружества в целом, минимизация экономического ущерба при возможном возникновении вспышек ящура, координация и гармонизация (оптимизация)

совместных действий ветеринарных служб стран СНГ в этих направлениях [95].

После принятия Программы в большинстве государств Содружества были разработаны и приняты национальные программы по профилактике и борьбе с ящуром, осуществлены конкретные мероприятия по их выполнению, по усилению мер, направленных на предупреждение заноса и распространения ящура. Отмечено укрепление материально-технической базы ветеринарных служб стран СНГ, повышение квалификации ветеринарных специалистов, улучшение координации совместных действий ветеринарных служб, их информационное обеспечение. Успешно проведены мероприятия по купированию и ликвидации возникавших единичных ящурных очагов (Республика Казахстан, Кыргызская Республика, Российская Федерация, Республика Армения) [139].

В целях реализации Программы ветеринарными службами государств-участников СНГ проводились важные профилактические и организационные мероприятия, способствующие предотвращению возникновения и распространения ящура.

В Республике Армения в целях недопущения заноса ящура ежегодно в плановом порядке осуществлялись систематические противоящурные мероприятия. На их проведение государство в рамках целевой программы “Мероприятия по недопущению и ликвидации ящура” ежегодно выделяло финансовые средства. Наряду с Законом “О ветеринарии” и целевой программой “Мероприятия по недопущению и ликвидации карантинных и особо опасных заразных болезней животных в Республике Армения” принят нормативный правовой акт, регламентирующий порядок идентификации сельскохозяйственных животных. На территории республики действует буферная зона, которая охватывает 12 пограничных районов с Турцией и Ираном. Ежегодно со стороны ФАО/МЭБ/ЕС Республике выделяется вакцина производства ФГУ “ВНИИЗЖ” для использования в этой зоне. В стране осуществляется эпизоотологический и иммунологический мониторинг, в том числе и для определения эффективности вакцинации [106].

Ветеринарной службой Российской Федерации прилагаются большие усилия по реализации Программы в целях предотвращения возникновения и распространения ящура как в России, так и на территории других государств-участников СНГ. Россельхознадзором совместно с ФГУ “ВНИИЗЖ” был разработан и Министерством сельского хозяйства РФ 20

декабря 2004 г. утвержден план конкретных мероприятий по реализации Программы.

В соответствии с принятой стратегией и существующими планами за последние годы в России функционирует противоящурная буферная зона, в которой за счет федерального бюджета ежегодно с использованием 20-22 млн доз вакцины осуществляется систематическая профилактическая вакцинация животных против ящура типов А, О и Азия-1 в 34 регионах страны, граничащих с Республиками Азербайджан, Грузия, Казахстан, Китаем, Монголией, а также в Московской и Владимирской областях вокруг биопредприятий, работающих с вирусом ящура [56, 98, 99].

Для контроля уровня популяционного противоящурного иммунитета по указанию Россельхознадзора проводится специальная мониторинговая программа, по которой в регионах буферной зоны систематически осуществляется отбор сывороток крови от вакцинированных против ящура животных и исследование их в ФГУ «ВНИИЗЖ». Большой объем сывороток крови от животных буферной зоны с отрицательным результатом тестировался и на выявление антител к неструктурным белкам вируса ящура для подтверждения отсутствия циркуляции вируса. Благодаря осуществлению такой стратегии подавляющее большинство субъектов Российской Федерации длительное время является благополучным по ящуру [25, 82, 154].

ФГУ «ВНИИЗЖ» регулярно поставляет государствам-участникам СНГ различные диагностикумы, проводит массовые исследования сывороток крови для оценки иммунного фона у вакцинированных животных в этих странах, оказывает помощь в типировании вируса ящура, проведении противоэпизоотических мероприятий и семинаров, обучении ветеринарных специалистов [13, 56].

ФГУ «ВНИИЗЖ» изготовляло наборы для идентификации противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА, наборы для выявления антигена вируса ящура в ИФА, а также антигены и специфические сыворотки для диагностики 7 типов вируса ящура в РСК, которые были поставлены в Республики Азербайджан, Армению, Казахстан, Узбекистан, Беларусь, Кыргызскую Республику, Монголию и Россию, осуществляло периодическое информирование ветслужб стран СНГ и Балтии о появляющихся новых вариантах вируса ящура и их опасности [30, 53, 54].

Из анализа современной эпизоотической ситуации по ящуру в мире, в первую очередь в пограничных и приграничных со странами СНГ государствах, широкого развития межгосударственных хозяйственно-экономических, культурных и иных отношений следует, что многие мероприятия “Программы совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах Содружества”, которые были предусмотрены к выполнению на период до 2010 г., остаются актуальными как в настоящее время, так и на ближайшие годы. Признано целесообразным продлить срок мероприятий Программы на период 2011-2020 гг. и поручить ФГУ “ВНИИЗЖ” подготовить предложения, уточнения и дополнения отдельных положений Программы [95, 216].

Ветеринарным службам государств-участников СНГ в первую очередь следует обеспечить своевременное информирование государств-участников СНГ о возникновении очагов ящура на своих территориях, срочную доставку патматериалов от подозреваемых и больных животных с клиническими признаками ящура в ФГУ “ВНИИЗЖ” для определения типа вируса и выяснения возможного источника инфекции. Указанные действия позволят принять срочные согласованные действия при заносе в страны СНГ новых вариантов возбудителя, против которых применяемые вакцины могут быть малоэффективными [217, 274, 277].

Наряду с выполнением мероприятий, указанных в Программе, утвержденной в 2004 г., на период 2011-2020 гг. с учетом Концепции повышения продовольственной безопасности государств-участников СНГ, утвержденной решением Совета глав государств СНГ 19 ноября 2010 г., предусматривается проведение работ в следующих направлениях:

- совершенствование нормативно-правового обеспечения для реализации мероприятий ветеринарными службами стран СНГ;
- дальнейшая унификация в соответствии с требованиями МЭБ порядка, средств и методов диагностики болезни, типирования и идентификации полевых изолятов вируса ящура;
- увеличение объемов молекулярно-биологических исследований по изучению выделенных изолятов вируса ящура и определению степени их родства с циркулирующими эпизоотическими штаммами в различных регионах мира;

- расширение систематических мониторинговых исследований с целью выявления переболевших ящуром животных и вирусоносителей, в том числе среди диких животных (косуль, сайгаков, кабанов и др.);
- дальнейшее совершенствование средств и методов диагностики, профилактики и мер борьбы с ящуром в странах СНГ в соответствии с рекомендациями МЭБ;
- осуществление совместных учений стран СНГ в целях отработки действий срочного реагирования на случай возникновения ящура на их пограничных территориях;
- создание групп быстрого реагирования в странах СНГ, организация обучения и стажировок ветспециалистов с целью повышения их квалификации по вопросам диагностики, профилактики и методов борьбы с ящуром;
- разработка, согласование и осуществление мероприятий по созданию единой противоящурной буферной зоны для стран СНГ в связи с образованием Таможенного союза Российской Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан;
- разработка, согласование и осуществление мероприятий по созданию и поддержанию в ФГУ «ВНИИЗЖ» на договорной основе для стран-участников СНГ единого централизованного резерва диагностикумов и вакцин, против экзотических типов вируса ящура.

Таким образом, итоги реализации Программы дали основание положительно оценивать ее роль в улучшении эпизоотической ситуации по ящуру в странах СНГ, что и позволило государствам СНГ производить конкурентоспособную, соответствующую национальным интересам животноводческую продукцию, выходить без ограничений на международный рынок с продукцией животноводства и повышать продуктивность и рентабельность агропромышленного комплекса.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Вирусы. Экспериментальную работу проводили с использованием следующих типов, штаммов и изолятов вируса ящура и африканской чумы свиней :

- производственные штаммы культурального вируса ящура О₁, А₂₂ и Азия-1.
- эпизоотические изоляты вируса ящура типа А (Армения/98), О (Пан Азия-2) и Азия-1 (№48), выделенные в неблагополучных хозяйствах республики.
- эпизоотические изоляты вируса АЧС, генотип II, поразивший Грузию, а затем и соседние страны, в том числе и Армению.

Подопытные животные. В экспериментальных исследованиях использованы:

- крупный рогатый скот годовалого возраста в количестве 62 голов, которые были приобретены Армяно-Российским совместным предприятием «Биопрепарат» для проведения контроля вакцин (2006-2008гг.) .
- Кроме того, в различных хозяйствах республики (буферная зона) под наблюдением находились свыше 100 тыс. гол.крупного рогатого скота (Армавир, Арарат Ширак, Сюник);
- свиньи 65 голов (2007-2011гг. с.Котайк и Нубарашен) – для изучения биологических свойств вируса ящура и АЧС, а также для адаптации штаммов О, А, Азия-1 и вируса АЧС к данному виду животных;
- морские свинки 1200 голов, массой 450-500 г использовали для адаптации вируса ящура и контроля иммуногенности вакцин;
- мышата сосуны 10000 голов, 2-3 дневного возраста для определения титра инфекционности вируса ящура и для реакции нейтрализации ;

Культуры клеток. Для изучения вируса ящура в работе использовали перевиваемые линии клеток ВНК-21/13 (почка сирийского хомячка), IB-RS-2 (почка поросенка), ПСГК-30 (почка сибирского горного козерога). Перевиваемые линии клеток поддерживали в лаборатории в соответствии с требованиями прилагаемыми к ним паспортов.

Первичную культуру клеток почек свиней (СП) получали из почек поросят 1-2 месячного возраста.

Для изучения вируса АЧС использовали первичные культуры клеток костного мозга или лейкоциты крови свиней (ККМС, ККЛ).

Питательные среды. Для культивирования первичной культуры клеток почек поросят использовали 0,5% раствор гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса (ГЛАХ). Перевиваемые линии клеток ВНК-21/13 и IB-RS-2 культивировали на среде Игла, клетки ПСГК-30 – на 0,5% растворе гидролизата-лактальбумина в солевом растворе Эрла (ГЛАЭ) с 0,25% глюкозы и 0,01% дрожжевого экстракта. Ко всем ростовым средам добавляли 10% сыворотку крупного рогатого скота.

Поддерживающие среды для культивирования и титрования вируса имели тот же состав, что и среды роста, но не содержали сыворотки крупного рогатого скота.

Среда покрытия состояла из 0,5% агара “Дифко” на поддерживающей среде с рН среды 7,6-7,8. Для ее приготовления использовали поддерживающую среду с удвоенной концентрацией всех компонентов и 1% стерильный водный раствор агара “Дифко”, которые смешивали в равных объемах непосредственно перед внесением агарового покрытия в культуральные сосуды.

Получение первичной культуры почек поросят и культуры костного мозга свиньи. Трипсинизацию почечной ткани поросят проводили горячим методом. Измельченную ткань после отмывания оставляли для инкубации в подогретом до 37°C 0,25% растворе трипсина на 30 минут. Экстракции проводили при 37°C в течение 20-30 минут. После центрифугирования, клетки ресуспендировали средой роста до посевной концентрации 600-700 тыс./мл. Культивирование клеток проводили при 37°C в стационарных и ролерных условиях до полного образования монослоя (5-6 дней) со сменой среды через 3-4 суток культивирования. После этого заражали вирусом ящура.

Культура костного мозга свиньи. Из костного мозга бедренных костей здоровых поросят (возраст 3-4 месяца) отдельно готовили первичную суспензионную культуру клеток костного мозга (ККМС). Культивацию клеток ККМС проводили в среде RPMI 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой с добавлением L-глутамина и антибиотиков в атмосфере CO₂. Одновременно с посевом клеток в часть флаконов добавляли вирус АЧС в определенной концентрации, после чего через 24, 48 и 72 часа из суспензии клеток контрольной и опытной

культуры клеток ККМС (костный мозг) просматривали под микроскопом на наличие гемадсорбции.

Поддерживание перевиваемых линий клеток. Поддерживание перевиваемых линий клеток осуществляли последовательными пересевами и хранением в жидком азоте при -196°C .

Адаптация вируса к клеточным культурам. Адаптацию вируса проводили по общепринятой методике с использованием прямых пассажей (15-20). В качестве исходного вирусного материала использовали 10% суспензию афт, кровь лимфоузлов и другие органы, приготовленные на поддерживающей среде (рН 7,6). Для последующего пассирования использовали культуральную жидкость предыдущего пассажа после замораживания и оттаивания, разведенную поддерживающей средой в соотношении 1:50-1:100. Степень адаптации вирусов ящура и АЧС к клеточным культурам оценивали по скорости появления ЦПД (ящур) и на наличие гемадсорбции (ВАЧС), степенью их выраженности и уровню накопления вирусов.

Культивирование вируса. Вирусы культивировали в первичной культуре клеток поросят, в культуре костного мозга свиньи и перевиваемых линиях клеток (ВНК-21/13, ИВ-RS-2, ПСГК-30). С этой целью культуру заражали (1,0 мл) 10%-ной суспензией адаптированного вируса ящура и АЧС с титром инфекционности не менее $7,5-8,0 \lg \text{ЛД}_{50}$. Через 24, 48, 72 часов отбирали вирусосодержащую жидкость и оставляли при -20°C в течение одного дня.

Очистка вирусосодержащей суспензии. Суспензию вируса готовили на основе 1/5 М ФБР (фосфатно-буферный раствор), рН 7,6, после чего добавляли ПЭИ или ПЭПА в конечной концентрации 0,05-1%. Растворенные соединения экстрагировали с помощью 5%-ного раствора хлороформа, смесь перемешивали до ее обесцвечивания и отстаивали для седиментации флокулированных белков в течение 24-48 часов. Надосадочную жидкость использовали в работе.

Концентрирование вирусов ящура и АЧС. Концентрирование антигена осуществляли сорбцией на ГОА (гидрат окиси алюминия), бентоните и полиэтиленгликолем (ПЭГ). Концентрирование сорбцией проводили путем добавления соответствующего количества

сорбента (рН 7,4-7,8), смесь тщательно перемешивали и отстаивали в течение 12-28 часов. Надосадочную жидкость удаляли после центрифугирования или отстоя. При концентрировании ПЭГ-ом сначала в суспензию последовательно добавляли NaCl до 0,5 М концентрации и 10% кристаллического ПЭГ. Смесь выдерживали при 4-8°C в течение 18-20 часов и после отделяли осадок центрифугированием при 2000-3000об/мин. с последующим ресуспендированием его в буферном растворе в 1/10 исходного объема.

При оценке адсорбционных свойств сорбентов по отношению к вирусам ящура и АЧС в 10% суспензию добавляли испытуемый сорбент до нужной концентрации. Спустя определенное время брали надосадочную жидкость и в ней определяли титр инфекционности для культуры клеток.

Инактивация вируса ящура. Инактивацию проводили с использованием АЭЭИ. Инактивант вносили в суспензию в концентрации 0,05% и проводили инактивацию при температуре 26-27°C в течение 24 часов. Остаток инактиванта нейтрализовали 2%-ным раствором тиосульфата натрия из расчета 15 мл на литр суспензии с добавлением рН 7,4-7,5.

Изучение активности инактивантов проводили путем определения величины K_{50} . Метод заключается в определении концентрации инактивантов, обеспечивающей защиту от заболевания 50%-ов зараженных мышат-сосунов (K_{50}). K_{50} определяют по формуле Кербера и Ашмарина:

$$\lg K_{50} = \lg K_n - \sigma(\sum Li - 0,5),$$

где K_n – максимальная инактиванта в вирусном препарате, при которой не заболевают ящуром все зараженные животные,

σ – логарифм кратности испытанных концентраций инактиванта,

Li – отношение количества не заболевших животных к количеству зараженных,

Σ – сумма значений Li для всех испытанных концентраций инактиванта.

В точно отмеренные объемы вирусосодержащего препарата добавляли инактиванты, получая двукратно возрастающие конечные концентрации. В образцах устанавливали одинаковые значения рН среды, температуры и времени инактивации.

Динамику инактивации инфекционности вируса ящура проводили после выяснения величины K_{50} . В вирусную суспензию вносили инактивант до концентрации в несколько раз

превышающей K_{50} . Смесь инкубировали при заданной температуре, отбирали пробы суспензии и хранили в замороженном виде до испытания на инфекционность. Снижение титра инфекционности характеризует скорость инактивации и уровень специфической безопасности вакцины для определенной длительности инактивации.

Конъюгаты для ящура

Россельхознадзор ГУ “Федеральный центр охраны здоровья животных” (ФГУ “ВНИИЗЖ”)

- Антиген ящурный штаммоспецифический, сухой для серологических реакций ТУ 9388-006-00495527-99, тип Азия-1 – штамм №48, титр 1:8, серия №3, контроль №23, дата изготовления 01.2007.
- Антиген ящурный штаммоспецифический, сухой для серологических реакций ТУ 9388-006-00495527-99, тип A_{22} – штамм №550, титр 1:8, контроль №2, дата изготовления 01.2007
- Антиген ящурный ТУ 9388-006-00495527-99, тип А №1707 – штамм Армения/98, титр 1:16, дата изготовления 01.2007
- Антиген ящурный штаммоспецифический, сухой для серологических реакций ТУ 9388-006-00495527-99 Тип O_1 – штамм №194, титр 1:16, контроль №22, дата изготовления 01.2007
- Сыворотка ящурная тип-И штаммоспецифическая для серологических реакций, используемая в диагностических целях. ТУ 9388-005-00495527-99, тип А – штамм №1707 “Армения/98”, титр 1:40, серия 2 контроль №12, дата изготовления 08.2005
- Сыворотка ящурная тип-И штаммоспецифическая для серологических реакций, используемая в диагностических целях. ТУ 9388-005-00495527-99, тип A_{22} – штамм №550, титр 1:40, серия 4, контроль №28, дата изготовления 01.2007
- Сыворотка ящурная тип-И штаммоспецифическая для серологических реакций, используемая в диагностических целях. ТУ 9388-005-00495527-99, тип O_1 – штамм №194, титр 1:20, серия 3, контроль №29, дата изготовления 01.2007

- Набор для определения противоящурных антител в сыворотках крови сельскохозяйственных животных в иммуноферментном анализе ТУ 9388-105-00495527-02, тип Азия-1, тип А₂₂, тип О₁
- IZSLER:Brescia, Italy IAH: Pirbright, UK FMDV ANTIGEN DETECTION ELISA Store at 2-8°C.Lot: 01-2011 111117/ff , Exp: June 2013
- Комплемент сухой для реакции связывания комплемента ГОСТ 16446-78
- Сыворотка гемолитическая для реакций связывания комплемента ГОСТ 16445-78
- Набор для (ПЦР) амплицированный к ДНК гена VP1 fmol DNA Cycle Sequencing Sistem (Promega USA)

Конъюгаты для АЧС

- IMGEZIM PPA COMPAC
 - 1.1. PPA к.3. – антитела АТ производства Испании – Мадрид
- IMGEZIM PPA DAS
 - 1.1. PPA к.2. – антиген Ag производства Испании – Мадрид
- Конъюгат для МФА – метода флюоресцирующих антител
Мадрид – Испания, ACE Ref. Laboratory
- Конъюгат для ПЦР-метода полимеразной цепной реакции

Определение вирусосодержащих антигенов и титры противовирусных антител.

Реакция связывания комплемента (РСК) – Принцип РСК заключается в присоединении комплемента к комплексу “антиген-антитело”. При наличии комплемент-связывающих антител в исследуемой сыворотке комплемент связывается с этим комплексом, что выявляется при введении в реакцию индикаторной системы (“эритроциты барана-гемолитическая сыворотка”) по отсутствию гемолиза. Отсутствие или низкий уровень антител в сыворотке способствует гемолизу эритроцитов. Титр реакции определяется максимальным разведением испытуемой сыворотки, в которой наблюдается задержка гемолиза. РСК является наиболее распространенным серологическим методом идентификации типов и штаммов вируса ящура и оценки иммуногенной активности антигенов, который выполняется в различных модификациях.

Реакция нейтрализации (РН) – При взаимодействии вируса с антителами происходит нейтрализация инфекционной активности вируса вследствие блокады антигенных детерминант, ответственных за соединение вирусной частицы с чувствительными клетками. В результате вирус теряет способность размножаться в чувствительной к нему биологической системе *in vitro* и *in vivo*. Уровень вируснейтрализующей активности сыворотки выражается разведением, обеспечивающим 50%-ный защитный эффект. Чувствительность РН в 10-100 раз выше, чем РСК. Особые преимущества метод имеет при постановке ретроспективного диагноза, оценке степени иммунологического родства между штаммами, исследованиях напряженности и длительности иммунитета.

Реакция гемадсорбции – Реакцию гемадсорбции проводят в культуре лейкоцитов и костного мозга свиней. Для выделения и концентрации лейкоцитов используют центрифугирование с последующим сбором лейкоцитов с поверхности осадка или дифференциальную седиментацию.

По методике Малмквиста, Хейя и модификации Хесса, Де Трея с применением трансфузионного аппарата, кровь берут из передней полой вены свиньи. После дефибрирования кровь центрифугируют при 200 об/мин. в течение 30 минут, пипеткой отсасывают поверхностный слой сыворотки, затем осторожно отсасывают следующий слой, богатый лейкоцитами. После механического взбалтывания лейкоциты и сыворотку помещают в пробирки 16x160 мм и инкубируют при 37°C в наклонном положении [296].

Костный мозг извлекают из бедренной кости только что убитой свиньи, отделяют от трабекул, отстаивают, чтобы отделить кусочки кости и грубые частицы, помещают в среду для культивирования.

Основным преимуществом этой методики является то, что лейкоциты и клетки костного мозга находятся в сыворотке донора с достаточным для проявления гемадсорбции количеством эритроцитов и то, что отпадает необходимость смены среды в течение жизни лейкоцитов. Этот метод рекомендуется для получения большого количества культур при проведении диагностических исследований в широких масштабах.

Метод флюоресцирующих антител (МФА). Наиболее быстро диагноз АЧС ставят прямой и непрямой флюоресценцией. Метод используют при сомнительной гемадсорбции

или ее отсутствии. Применение МФА помогает избежать возможных ошибок, связанных с неспецифической агглютинацией эритроцитов и фагоцитозом, позволяет успешно обнаружить штаммы вируса, утратившие гемадсорбирующие свойства. Кроме того, МФА наиболее дешев.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Выявление противоящурных антител проводят в непрямом жидкофазном блокирующем варианте ИФА. В сенсibilированные вирусоспецифическими антителами планшеты вносят предварительно приготовленный комплекс: антиген плюс испытуемые сыворотки. При наличии противоящурных антител в исследуемой сыворотке, они связывают антиген, и он не может участвовать в реакции. В случае отсутствия антител в сыворотке, несвязанный антиген улавливается сенсibilизирующими антителами, адсорбированными на планшете. Фиксированный в пунктах антиген связывает детекторные антитела, которые реагируют с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой Хрена (конъюгат). Количество связанного фермента пропорционально количеству свободного антигена и определяется цветной реакцией, интенсивность которой оценивается визуально или на спектрофотометре.

При АЧС лабораторная диагностика базируется на обнаружении вируса во внутренних органах и крови павших, больных и вынужденно убитых животных. Для этого используют выделение в культуре клеток (костный мозг, лимфоциты, лейкоциты) электронную микроскопию, реакцию гемадсорбции, иммунофлюоресценцию. Однако эти методы трудоемки в исполнении и не обладают достаточной чувствительностью. Широко применяемая в настоящее время полимеразная цепная реакция имеет высокую стоимость и не всегда целесообразна при исследовании большого количества проб. Для обнаружения возбудителя асфавирусной инфекции (ASFV – *Asfaviidae*) также применяют различные варианты иммуноферментного анализа, которые обладают высокой чувствительностью, специфичностью, быстротой получения результатов и возможностью стандартизации.

При постановке непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа, исследуемый антиген вначале взаимодействует с улавливающими антителами, адсорбированными на поверхности полистиролового планшета, а затем с детекторными антителами с

последующим выявлением специфического комплекса с помощью фермента, активность которого проявляется хромогенным субстратом.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в диагностике инфекционных заболеваний животных. В последнее время все большее распространение получают новейшие методы диагностики, основанные на обнаружении в исследуемых клинических образцах специфических нуклеотидных последовательностей генома микроорганизмов. Наибольшее внимание среди этих методов привлекает ПЦР, в основе которой лежит многократное повторение циклов удвоения (амплификация) специфического участка нуклеотидной последовательности. Главное достоинство метода – очень высокая чувствительность: в результате амплификации концентрация специфической олигонуклеотидной последовательности в реакционной пробе возрастает в десятки миллионов раз.

ПЦР становится одним из наиболее используемых методов молекулярной биологии по следующим причинам: это быстрый, недорогой и простой метод производства микрограммовых количеств ДНК из небольшого количества исходного материала и вследствие относительно низких требований к качеству ДНК- или РНК-матрицы.

Исходным материалом для анализа генов методом ПЦР может быть геномная ДНК (в крайнем случае из единичной клетки или несколько хромосомных фрагментов, полученных на микроманипуляторе), РНК (возможно всего из нескольких клеток), нуклеиновая кислота из архивных образцов, клонированная ДНК или сами ПЦР-продукты.

ПЦР основана на амплификации ДНК с помощью ДНК-полимеразы, осуществляющей синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух олигонуклеотидных праймеров (заправок). Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать.

Для исследования ящур отбирали патологический материал в виде стенок афт от 2-3 больных животных в количестве не менее 5 г. У крупного рогатого скота брали стенки созревших непрорвавшихся афт с языка, у свиней – с “пяточка” или вымени, у мелкого рогатого скота – с беззубого края верхней челюсти, с кожи межкопытной щели или венчика. Афты были свежие, плотной консистенции, не издающие гнилостного запаха.

При доставке в лабораторию стенок афт от больных животных для определения типа и варианта вируса ящура, в максимально короткий срок проводили исследование в РСК. С этой целью из афтозного материала готовили антиген по следующей методике. Стенки афт отмывали физиологическим раствором рН 7,4-7,6, высушивали фильтровальной бумагой, взвешивали, измельчивали и растирали в фарфоровой ступке с битым нейтральным стеклом до получения однородной массы. Антигены для РСК готовили в виде 33%-ной суспензии (1:3) путем добавления к полученному весу афтозного материала двойного количества физиологического раствора. Полученную взвесь экстрагировали при комнатной температуре в течение 2-х часов и промораживали при температуре минус 6-20°С в течение 5-18 часов.

После размораживания антиген центрифугировали 10-15 минут при 5000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливали и инактивировали при 58°С в течение 40 минут. После инактивации надосадочную жидкость повторно центрифугировали и использовали в РСК.

Эффективность выделения вируса из патологического материала повышается при использовании методов очистки и концентрирования вирусосодержащих суспензий.

Для этой цели в суспензию используемого материала добавляли фреон-113 в равном количестве к ее объему или хлороформ (10% к объему суспензии). После гомогенизации в течение 15-20 минут и центрифугирования в течение 20 минут проводили концентрирование надосадочной жидкости полиэтиленгликолем с молекулярным весом 6000. К надосадочной жидкости добавляли 7,5% полиэтиленгликоля, встряхивали до растворения и оставляли в холодильнике при температуре 4°С на 2 часа. Затем центрифугировали при 4000-6000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а образовавшийся осадок разбавляли фосфатным буфером или физиологическим раствором в объеме в 10-20 раз меньше, чем исходное количество взятой суспензии. Подготовленный материал использовали для испытания на наличие вируса.

На основании опыта отечественных и зарубежных исследователей, для выделения вируса ящура нами использовалась следующая схема (Рис. 1).

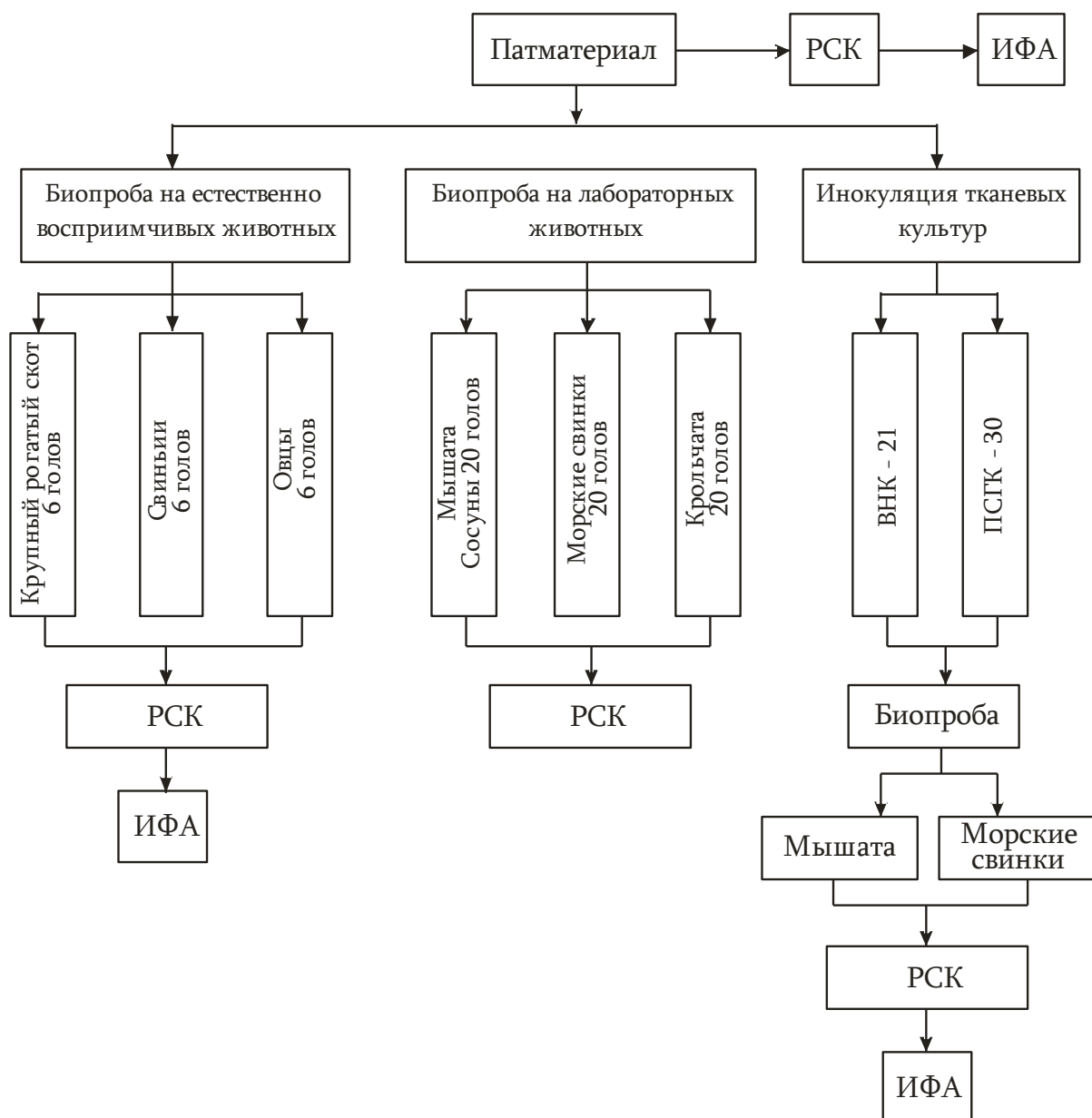


Рис. 1. Выделение вируса ящура

Лучшим, хотя и дорогостоящим методом обнаружения вируса ящура в патологическом материале является биопроба на крупном рогатом скоте. 10%-ную суспензию полученного материала (типа А, О, Азия-1) вводили телятам (по 2 гол.) в возрасте 3 месяцев и старше, по 0,1 мл в слизистую оболочку языка в нескольких точках. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением специфичности материала в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура. Чаще всего для постановки биопроб использовали мышат-сосунов 2-3 дневного возраста и морских свинок весом не менее 500 г. Мышатам-сосунам 10%-ую суспензию испытуемого материала вводили под кожу в дозе 0,2 мл или внутривенно в дозе 0,1 мл. Появление парезов или параличей конечностей, а затем

гибель мышат с подтверждением специфичности в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура в испытуемом материале. Морским свинкам 10%-ную суспензию испытуемого материала методом туннелирования вводили внутрикожно в плантарную поверхность лапок. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением их специфичности в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура.

Высококчувствительным методом выделения вируса является инокуляция культур клеток. В этих целях чаще всего использовали однослойную культуру первично трипсинированных клеток СП и перевиваемые культуры клеток ВНК-21 и ПСГК-30.

Изготовление сорбированных вакцин. Для составления объединенной серии вакцин к инаktivированному полуфабрикату, содержащему 30% сорбента-адьюванта ГОА с 3% концентрацией Al_2O_3 добавляли в качестве дополнительного адьюванта 10% растворы сапонины или нуклеината натрия до конечной концентрации 0,5%.

Оценка токсичности адьювантов. С целью изучения острой токсичности определяли максимально переносимую дозу (МПД), при которой не наблюдается гибель животных; летальную дозу ($ЛД_{100}$), которая вызывает гибель всех подопытных животных; токсическую дозу ($ЛД_{50}$), вызывающую гибель 50% животных.

Адьювантные свойства препаратов изучили исходя из иммуногенной активности вакцин путем выявления 50%-ной иммунизирующей дозы ($ИМД_{50}$) на морских свинках, а также по состоянию гуморального иммунитета – путем определения титра вируснейтрализующих антител с помощью РН и ИФА.

Контроль иммуногенности вакцин. При определении иммуногенности вакцин руководствовались ТУ “Вакцина против ящура, сорбированная, моно- и поливалентная”. Кроме того, определение иммуногенности на морских свинках проводили новым разработанным “сейс”-методом.

При сейс-методе в опыт брали 20 голов морских свинок (плюс 4 головы на контроль вируса), которым внутримышечно в дозе 2,0 мл вводили разведение вакцины 1:40. Заражение проводили на 21 день после вакцинации с использованием 10^4 $ИД_{50}/0,2$ мл гомологичного вируса, адаптированного к морским свинкам.

Учет результатов ИМД₅₀ проводили по методу Кербера и Ашмарина, т.е. по отношению числа животных, заболевших генерализованной формой ящура, к общему числу животных. Выведена коррелятивная зависимость, а именно: если из 20 голов МРС 10 противостояли заражению генерализованной форме ящура, то вакцина в пересчете содержит более 7 ИМД₅₀ КРС и более 25 ИМД₅₀ МС. Такую вакцину можно выпускать в объеме 2,0 мл. Если показатели ниже 10, т.е. заболело генерализованной формой 11-12 животных, а противостояло 8-9 голов, то вакцину выпускают в 3,0 мл. В случае, если показатели ниже 8, то проводят повторные исследования, и если они подтверждают эти данные, то вакцину выбраковывают. Была также проведена оценка достоверности полученных результатов [425].

Определение стерильности вакцин. Проводили согласно с ГОСТ-ом 28085-89 “Препараты биологические. Методы бактериологического контроля. Стерильность”. Вакцину считали стерильной при отсутствии роста микрофлоры в посевах.

Проверка вакцины на безвредность. За вакцинированными животными вели наблюдение в течение 10 дней. Вакцину считали безвредной, если все животные в течение указанного времени оставались клинически здоровыми и на месте введения вакцины не было воспалительной реакции.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА III. ЯЩУР

3.1. Занос экзотических типов вируса ящура на территорию Армении и анализ эпизоотических данных

Ящур эндемичен или периодически возникает в соседних странах Азии, что создает постоянную угрозу заноса инфекции в Армению. Так, например, зарегистрированные в нашей стране в 1998, 2000, 2001, 2002, 2007 (НКР) и 2016 гг. вспышки ящура стали следствием заноса инфекции из Ирана и Турции.

Возможность возникновения новых эпизоотических очагов ящура зависит от многих условий, а именно, от наличия контингентов восприимчивых животных, своевременности, полноты проведения противоэпизоотических мероприятий и условий содержания или эксплуатации животных. Таким образом, эпизоотический процесс может развиваться и поддерживаться только при наличии трех непосредственно действующих факторов: источника инфекции, механизма передачи и восприимчивого поголовья. При условии комплексного воздействия на все три звена эпизоотической цепи можно достичь надежной профилактики и искоренения болезни.

Эпизоотический процесс – явление сложное, на которое воздействуют не только чисто биологические особенности, но и социальные факторы. Поэтому мероприятия по борьбе с эпизоотиями ящура будут эффективными и дадут надежные результаты в случае планового их проведения. Основное внимание должно уделяться в каждом случае наиболее важным звеньям эпизоотической цепи, будь то уничтожение возбудителя, вакцинация восприимчивого поголовья и изоляция его от источников инфекции.

Санитарная охрана нашей территории направлена на создание стойкого благополучия, исключения заноса возбудителей болезней. Для этого весь поступающий скот, продукты и сырье животного происхождения подвергаются ветеринарно-санитарному осмотру. Возникает вопрос, возможен ли в таких условиях занос вируса из сопредельных стран? Оказывается, еще возможен. Так, например, в 1998 году из Ирана в Турцию занесен вирус типа А, а из Турции – в Армению, который не регистрировался с 1991 года. В 2000 году из

Турции в Армению занесен вирус Азия-1. В 2001 году из Турции в Армению (Ширакская область) – тип О.

Самую тяжелую для нашей республики эпизоотию вызвал занос из Турции вируса А № 1707 (Армения/98). В силу различных причин эпизоотия А-98 возникла в разных областях, а затем быстро распространилась по всей республике, нанеся колоссальный ущерб сельскому хозяйству. Быстрому распространению эпизоотии способствовала чрезвычайная восприимчивость крупного рогатого скота к вирусу А № 1707 (Армения/98) и высокая его контагиозность.

Значительно меньше по экономическому ущербу и последствиям была эпизоотия, вызванная вирусом типа О, который был занесен в Армению в конце августа 2001г. Источником вируса являлся больной турецкий скот, выпасавшийся за инженерными сооружениями погранвойск, где находились кочевки крупного и мелкого рогатого скота Ширакской области. Ящуром заболел, в основном, крупный и мелкий рогатый скот. Свиньи болели в меньшем количестве случаев. За период 1998-2002 годы ящур был зарегистрирован в Ширакском марзе (Приложение, рис.2).

К этому времени была информация МЭБ, что циркулируемый в Турции вирус имеет большие антигенные различия с вирусом А₂₂. Опасения оказались правильными: выделенный изолят был определен как новый вариант и получил название “Армения/98”.

Комплекс ограничительных мероприятий, вынужденные двухкратные прививки бивалентной вакциной А-О позволили исключить возможность распространения инфекции на территории Ширакского марза.

В 1999 году ящур в республике не регистрировался. Однако, анализ анамнестических данных свидетельствует о том, что в ряде хозяйств Котайкской и Гехаркуникской областей отмечались единичные случаи ящура. Заболевание среди КРС протекало легко, с незначительным охватом поголовья, что связано с наличием большой прослойки иммунных животных. По-видимому вспышки были обусловлены вирусом типа О.

Согласно данным МЭБ, в октябре-ноябре 1999г. в Иране и Турции широкое распространение получил вирус ящура типа Азия-1. Это обстоятельство значительно затруднило ситуацию, т.к. последний случай ящура, вызванный вирусом ящура типа Азия-1,

был зарегистрирован в 1984г., а начиная с 1999г. животные против данного типа не прививались.

Рассматривая современную ситуацию по ящуру с учетом мирового опыта борьбы, можно отметить, что ликвидация его на больших территориях возможна лишь в рамках тесного международного сотрудничества.

Главной стратегической задачей единой комплексной системы противоящурных мероприятий в бывшем СССР являлось создание буферных зон в Закавказье, чтобы сдерживать проникновение экзотических типов вируса из стационарно неблагополучных по ящуру сопредельных стран – Турции и Ирана. Эта задача была успешно решена. Систематическая поголовная вакцинация крупного и мелкого рогатого скота поливалентными вакцинами с высокой протективной активностью способствовала стабилизации ситуации и уже к 1990 г. было установлено сравнительное благополучие. Однако, в дальнейшем, достигнутые позиции и положительные результаты были полностью утрачены. Уже с 1996г. эпизоотическая ситуация резко обострилась. Кроме того, сложность ситуации заключалась в том, что циркулирующие штаммы имели значительные антигенные отличия от ранее выделенных и производственных штаммов, поэтому применяемые средства активной профилактики оказались малоэффективными.

За период с 1998 по 2007гг. в Армении зарегистрировано несколько эпизоотических вспышек ящура, вызванных вирусом типов А (1998), Азия-1 (2000), О (2002) и О (2007 НКР) (таблица 1 и Приложение, рис.3).

Таблица 1

Доля неблагополучных пунктов по ящуру за 1998-2007 гг.

Тип вируса	Годы	Наименование марзов и районов	Общее кол-во населенных пунктов	Число неблагополучных пунктов	Доля неблагополучия (Н), %
А	1998	Амасия	26	7	26,9
		Ахурян	36	11	30,5
Азия-1	2000	Амасия	26	19	73,0
О	2002	Ашоцк	25	17	68,0
О	2007	Нагорно-Карабахская Республика	35	13	37,1

Во всех случаях вспышки ящура были обусловлены заносами из сопредельной Турции на участках пограничных летних пастбищ Дарин-Дара (Амасийского района).

В отношении типа А было установлено, что однократная прививка комерческой вакциной, изготовленной на основании производственного штамма А₂₂, не обеспечивала защиту животных. Купировать развитие инфекции в 1998г. удалось только путем двухкратных, с интервалом 7-10 дней, прививок бивалентной вакциной А О, а в дальнейшем – полученной на основе полевого штамма А №1707 (Армения/98). Проведенные мероприятия позволили предотвратить занос экзотического штамма вируса в глубь территории республики.

Вспышки ящура типа Азия-1 на первоначальном этапе до применения средств специфической профилактики в районах Ширакской зоны нанесли значительный экономический ущерб. Однако, в дальнейшем, широкомасштабное применение вакцины из штамма А-48, причем также путем двухкратных, с интервалом 7-10дней, прививок крупного рогатого скота и однократных прививок овец, позволили ликвидировать ящур в первичных очагах. Заболевание в стране не регистрируется с 2002 года.

Наиболее распространенным, по всем показателям эпизоотического процесса, оказался вирус ящура типа О. За анализируемый период количество неблагополучных пунктов и заболевших восприимчивых животных ящуром типа О значительно превышало таковые при ящуре типов А и Азия-1. Кроме того, необходимо отметить важный факт тяжести течения болезни и коров, и молодняка до 3-4 месячного возраста.

Противоэпизоотическая эффективность применяемых вакцин из производственного штамма О₁₉₄ на однократно привитом поголовье была низкой, хотя по иммуногенной активности вакцины в прививном объеме содержали более 7 ИМД₅₀. Это обстоятельство требовало изменить направление исследований в плане замены производственного штамма. Во ВНИИЗЖ была получена поливалентная вакцина А, О, Азия-1, где уже использованы новые штаммы.

Эту вакцину применяли в хозяйствах приграничной зоны Армении в период весенних прививок 2003г. в рамках выполнения программы “Противоящурная буферная зона”.

Прорывы иммунитета на неоднократно иммунизированном поголовье и тяжесть течения болезни среди взрослого крупного рогатого скота были обусловлены несоответствием эпизоотического и производственного штаммов и, как следствие, слабой противоэпизоотической эффективностью применяемых серий вакцин.

Анализ эпизоотической ситуации показал, что по официальным данным до 1 апреля 2000г. ящур в республике не был зарегистрирован. В конце мая 2000г. отдельные вспышки ящура были зарегистрированы в Ширакской области (Анийский район).

Исследование патологического материала, взятого у КРС (с.Баграван) 15.06.2000г. показало, что заболевание вызвано вирусом типа О. В это же время ящур был зарегистрирован в хозяйствах Айкадзор, Харков, Джрапи. Заболевание отмечалось у МРС, что было вызвано вирусом типа О.

В июне 2000г. ящур был зарегистрирован в Амасийском районе. Заболевание протекало в “классической форме”. Особенно тяжело болели взрослый КРС, у которых отмечались осложнения на конечностях и на вымени. На основании проведенных исследований стало ясно, что заболевание вызвано вирусом типа Азия-1. В Амасийском районе ящур отмечался в Амасии, а также на пограничных с Турцией пастбищном массиве Дарин-Дара.

В Ашоцком районе заболевание отмечалось 08.06.2000г. в с. Бавра. В это же время ящур отмечался в Казанчи, Тавуте, Неркин Сепасаре, Верин Сепасаре. Был отобран патологический материал и проведена типизация. Нами был установлен тип вируса ящура Азия-1.

Сложность ситуации заключалась в том, что заболевание отмечалось в период пастбищного содержания животных. Отсутствие условий для изоляции больных животных, низкий уровень карантинных мероприятий, беспрепятственный вывоз молока из неблагополучных пунктов, отсутствие средств специфической профилактики предопределили развитие эпизоотии. Одновременно в других районах отмечались неблагополучные пункты, вызванные вирусом типа О.

По официальным данным ящур в 2001г. не был зарегистрирован. Однако на самом деле очаги инфекции отмечались в ряде хозяйств Араратского, Котайкского и Разданского районов.

Согласно данным МЭБ, в Ширакской области (Ашоцкий район) был зарегистрирован вирус ящура типа О.

Начиная с 2003г. по 2006 годы по официальным данным ящур в республике не был зарегистрирован.

По данным ветеринарной службы республики и специалистов ПКВП, дикие животные (кабаны, волки, лисицы, шакалы, зайцы) часто переходят из Ирана и Турции на территорию Армении и Нагорно-Карабахской Республики (НКР).

Опасность заноса постоянно существует в связи с различными межгосударственными экономическими, торговыми и хозяйственными взаимоотношениями. Так, например, НКР имеет общие границы с соседними государствами, которые также являются неблагополучными по ящуре. В связи с этим они являются причиной угрозы заноса возбудителя на территорию НКР.

В 2007году нами были исследованы две пробы афтозных эпителий крупного рогатого скота, поступившего в НЦЖВ из Нагорно-Карабахской Республики (Гадрутский район, село Айгестан). С помощью РСК и ИФА обнаружен антиген вируса ящура типа О (экспертиза №2041 от 31.07.2007г.), экзотический для НКР, о чем было сразу же уведомлено руководство ГВИ МСХ Армении.

Изучение эпизоотической ситуации позволило с большей степенью достоверности выявить источники и пути заноса вируса типа О. Больные дикие свиньи из Ирана переходили границу на пастбище “Кашатаг” НКР и, в силу плохо поставленной охраны пастбищ, находящихся за инженерными сооружениями пограничных войск, имели непосредственные контакты со скотом из хозяйств Гадрутского района.

По нашим наблюдениям, клиническое проявление заболевания отмечалось только у крупного рогатого скота. Заболевание сопровождалось отказом от корма, угнетением общего состояния, атониями преджелудков, тяжелыми осложнениями на вымени и конечностях.

Таким образом, основными причинами широкого распространения ящура явились не полное антигенное соответствие циркулирующего вируса и производственного вакцинного штамма, скрытие первичных очагов инфекции и неполный охват прививками поголовья КРС.

3.2.Идентификация эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных на территории Армении и Нагорно-Карабахской Республики (НКР) в 1998-2007 гг.

За период с 1998 по 2007 год включительно в лабораторию диагностики “НЦЖВ” ГНКО на исследование поступило 305 образцов вирусного материала из различных областей республики. Было проведено изучение типовой и вариантной принадлежности вируса ящура в РСК.

При определении типовой принадлежности вируса в РСК получены следующие результаты: к типу О отнесено 98 штаммов, к типу А – 111, к типу Азия-1 – 69 штаммов. Из 305 проб вирусного материала у 27 (8.9%) типовая принадлежность не была определена. Эти образцы в культуре ткани или на мышатах-сосунах не обладали инфекционными свойствами.

Подвергшиеся исследованию образцы вируса имели различное происхождение. От крупного рогатого скота было исследовано 272 пробы, от овец – 6 и от свиней – 27 проб. В таблице 2 приведены результаты определения типовой принадлежности эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных от различных видов животных (1998-2007гг.).

Таблица 2

Результаты определения типовой принадлежности эпизоотических штаммов вируса ящура, выделенных от различных видов животных (1998-2007гг.)

Вид животных	Исследовано проб вируса	Типы вируса ящура			Не типировано
		О	А	Азия-1	
КРС	272	95 (34,9%)	100 (36,8%)	69 (25,4%)	8 (2,94%)
Овцы	6	1 (16,7%)	1 (16,7%)	-	4 (66,7%)
Свиньи	27	2 (7,4%)	10 (37,04%)	-	15 (55,6%)
Итого:	305	98 (32,1%)	111 (36,4%)	69 (22,6%)	27 (8,9%)

Из данных, таблицы 2 видно, что из 272 образцов вирусного материала, отобранного от КРС, к типу О относилось 34,9%, к типу А – 36,8%, а к типу Азия-1 – 25,4% проб. Тип не был определен в 8 пробах патологического материала, что составляет 2,94% от числа всех исследованных проб. Из 6 образцов материала, полученных от овец, к вирусу типа О была отнесена 1 проба, к типу А – 1 проба и в 4-х пробах (66,7%) определить тип вируса ящура не

удалось. Из 27 проб вирусного материала, полученных от свиней, в 2-х пробах (7,4%) был установлен тип О, в 10 – тип А (37,04%) и в 15 пробах (55.6%) тип вируса не был установлен. Бросается в глаза большой процент нетипированного материала от овец и свиней. Этот факт, как правило, был связан с погрешностями в отборе материала и в транспортировке его в институт на исследование.

В таблицах 3 и 4 приведены результаты идентификации штаммов вируса ящура в РСК по годам и по областям республики.

Таблица 3

Результаты идентификации в РСК полевых образцов вирусного материала, выделенных на территории Армении в 1998-2007 гг.

Год	Кол-во исследованных проб	Типовая и вариантная принадлежность вируса						Нетипировано
		А				О	Азия-1	
		А ₂₂	А ₁₇₀₇ Армения/98	А ₇	Иран g7	О ₁₉₄	Азия-48	
1998	121	0	111	0	0	0	0	10
1999	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	95	0	0	0	0	51	31	13
2001	40	0	0	0	0	0	38	2
2002	36	0	0	0	0	36	0	0
2003	0	0	0	0	0	0	0	0
2004	0	0	0	0	0	0	0	0
2005	0	0	0	0	0	0	0	0
2006	0	0	0	0	0	0	0	0
2007	13	0	0	0	0	11	0	2
Итого	305	0	111	0	0	98	69	27

Из данных, приведенных в таблице 3 видно, что все штаммы вируса ящура типа О, выделенные в различные годы, были отнесены к одному и тому же варианту О₁₉₄. Идентифицированные в 2000-2001 гг. штаммы вируса ящура типа Азия-1 были отнесены к одному и тому же варианту. Что же касается штаммов вируса ящура типа А, то здесь зарегистрированы штаммы новой вариантной принадлежности, вирус ящура А №1707 “Армения/98”.

Результаты определения типовой принадлежности штаммов вируса ящура, поступивших для исследования в НЦЖВ из различных областей Армении с 1998 по 2007гг.

Области	Кол-во исследованных образцов	Типы вируса			Нетипировано
		О	А	Азия-1	
Ширак	200	34	111	45	10
Лори	4	0	0	4	0
Арагацотн	20	10	0	8	2
Тавуш	0	0	0	0	0
Котайк	20	0	0	12	8
Армавир	40	36	0	0	4
Арагат	8	7	0	0	1
Гегаркуник	0	0	0	0	0
Вайоц Дзор	0	0	0	0	0
Сюник	0	0	0	0	0
НКР	13	11	0	0	2
Итого	305	98	111	69	27

Следует отметить, что начиная с 1998 года, на территории Армении стали регистрировать новые вариантные штаммы вируса ящура типа А, которые по своим антигенным свойствам отличаются от производственных штаммов и эталонных вариантных штаммов, имеющих в нашем распоряжении. Так, в 1998 году в Ширакской области был выделен новый вариант вируса А №1707. Подробная антигенная характеристика этих штаммов вируса ящура дана в соответствующих разделах настоящей работы.

Данные исследований в РСК полностью согласовались с результатами ИФА (ELISA).

3.3. Изучение иммунобиологических свойств выделенных в Армении (1998-2016 гг.) изолятов вируса ящура

3.3.1. Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура типа А – “Армения/98”

В 1998 году в Республике Армения были отмечены очаги заболевания ящуром типа А крупного рогатого скота, иммунизированного бивалентной вакциной А₂₂О₁, в состав которой входил антиген из производственного штамма А₂₂ №550.

В августе 1998 года полевой материал в виде эпителия афт крупного рогатого скота, полученного из хозяйств Амасийского района, поступил в НЦЖВ для проведения лабораторной диагностики и идентификации выделенного возбудителя. Полевой материал был исследован в РСК по одностороннему родству. Было установлено, что г₁ в сравнении со штаммом А₂₂ №550 составлял всего 0,02. В связи с этим для более детального изучения иммунобиологических свойств выделенного возбудителя, материал нами был доставлен в Региональную справочную лабораторию МЭБ по ящуру ВНИИЗЖ.

Лабораторными исследованиями материала в РСК с использованием диагностических сывороток типа А было установлено, что исследуемый материал отрицательно реагировал с сывороткой А₂₂ №550 и давал положительную реакцию в цельном виде и в разведении 1:2 с сывороткой А₅ Вестервальд.

Методом прямого секвенирования в ПЦР первичной культуры гена и белка VP₁ было проведено сравнительное изучение полученных изолятов, производственных штаммов и полевых изолятов, выделенных на протяжении 1962-1998 гг. на территории стран СНГ и других государств мира. Сравнительный анализ установленных структур двух изолятов, выделенных в 1998 году в Армении, и эпизоотических изолятов, выделенных в последние годы в Турции и Иране (А-Иран-96, А-Турция-98), показал, что оба изолята идентичны между собой и отличаются от изолятов А-Турция-98, А-Турция-97 и А-Иран-96 по трем, четырем и семи нуклеотидным последовательностям, соответственно.

Установлено, что исследованные изоляты существенно отличаются от всех выделенных ранее штаммов вируса, в том числе и от вируса А₂₂, используемого в настоящее время в

России и странах СНГ для производства средств диагностики и специфической профилактики (производственный штамм А₂₂ №550).

Полученные результаты послужили основанием для более детального изучения иммунобиологических свойств выделенного возбудителя, получившего название штамм вируса ящура А №1707 “Армения/98”.

Вирус был освежен путем однократного пассирования на крупном рогатом скоте, после чего адаптирован к первично-трипсинизированной культуре клеток СП и перевиваемым линиям клеток ВНК-21, ПСГК-30 и ИВ-RS-2. Адаптацию вируса проводили по общепринятой методике путем проведения последовательных пассажей. Результаты адаптации представлены в таблице 5.

Таблица 5

Биологические свойства ящура штамма А №1707 “Армения/98”

Система репродукции вируса	Время проявления биологической активности, час	Количество адаптационных пассажей	Характеристика адаптированного материала	
			Активность в РСК	Титр инфекционности lg ТЦД ₅₀ /мл
СП	24	3	Цельн.	10 ^{6,0} -10 ^{7,0}
ПСГК-30	21	4	1:2-1:4	10 ^{6,6} -10 ^{7,2}
ИВ-RS-2	20-22	4	1:4	10 ^{7,0} -10 ^{7,2}
ВНК-21	20-24	4	1:4-1:8	10 ^{7,6} -10 ^{8,0}

Приведенные данные свидетельствуют о высоком накоплении штамма “Армения/98” вируса ящура в указанных культурах клеток. Наиболее высокий урожай вируса был в культуре клеток ВНК-21.

Для изучения антигенного родства штамма А №1707 “Армения/98” с производственным и некоторыми эталонными эпизоотическими штаммами вируса в РСК была получена гипериммунная сыворотка морских свинок. Гипериммунизацию животных проводили антигеном из концентрированного в 100 раз вируса, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21, в смеси с равным объемом масляного адьюванта .

В качестве антигена, используемого при постановке реакции, применяли очищенный, концентрированный в 100 раз, инактивированный вирус, репродуцированный в культуре перевиваемых клеток ПСГК-30.

Аналогичным способом были получены диагностические гипериммунные сыворотки и антигены на штаммы, используемые при постановке перекрестной РСК.

Постановку реакции и определение антигенного родства сравниваемых штаммов (r_1 , r_2 и R) проводили в соответствии с методическими указаниями по выделению и идентификации штаммов вируса ящура. Результаты этих исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6

Антигенный спектр вируса ящура штамма А №1707 “Армения/98” по данным РСК

n=3

Сравниваемые штаммы	Показатели		
	r_1	r_2	R %
А №1707 и А ₂₂ №550	< 0,02	0,34	8
А №1707 и А ₅ Вестервальд	< 0,02	0,34	8
А №1707 и А-Иран-87	< 0,02	0,26	7
А №1707 и А-Турция-97	1,0	0,46	68
А №1707 и А-Иран-96	1,0	0,26	51

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 6, штамм вируса А №1707 “Армения/98” значительно отличается по антигенным свойствам от производственного штамма А₂₂ №550, эталонного штамма А₅ Вестервальд и эпизоотического штамма, выделенного в Иране в 1987 году. Меньшие антигенные отличия были с вирусами, выделенными на территории Турции (1997г.) и Ирана (1996г.). Аналогичные результаты были получены с помощью реакции нейтрализации, где в качестве антител использовали сыворотки реконвалесцентов крупного рогатого скота, переболевшего ящуром после заражения указанными штаммами.

Исходя из полученных результатов исследований, можно констатировать, что выделенный в 1998 году на территории Армении штамм вируса А №1707 “Армения/98” по антигенному спектру является оригинальным, в таксономическом отношении новым, ранее неизвестным вариантом вируса ящура типа А.

Для снижения его эпизоотической опасности необходимо обеспечить лабораторную диагностику и вакцинопрофилактику, для чего необходимы высокоактивные и специфичные

антительные и антигенные диагностикумы и вакцина, полученные с использованием данного штамма в качестве производственного.

В дальнейшем в НЦЖВ были получены штаммоспецифические диагностические сыворотки и антигены и инактивированная противоящурная (экспериментальная) вакцина из вируса штамма А №1707 “Армения/98”, которую можно было использовать в качестве нового производственного штамма при изготовлении для республик Закавказья диагностикумов и вакцин с целью профилактики сельскохозяйственных животных от ящура.

В декабре 2015г. в хозяйствах в с.Аразап Армавирского марза РА среди КРС и свиней были отмечены очаги заболевания ящуром, которые были иммунизированы поливалаентной вакциной А,О,Азия-1, в состав которой входил антиген из производственного штамма А-Иран-2005. Для проведения лабораторной диагностики и идентификации выделенного возбудителя полевой материал в виде эпителия афт поступил в НЦОАРБПП и был исследован методами ОТ-ПЦР, ИФА, РСК, в результате чего был обнаружен геном и антиген вируса ящура типа А.

В январе 2016 года патологический материал нами был доставлен в Региональную справочную лабораторию МЭБ по ящуре “ВНИИЗЖ” г.Владимир, для более детального изучения биологических свойств выделенного возбудителя. По результатам нуклеотидного секвенирования с последующим филогенетическим анализом было установлено, что изоляты A/Armenia/1/11-01-2016, A/Armenia/2/11-01-2016, A/Armenia/3/11-01-2016, A/Armenia/4/11-01-2016 принадлежат к генетической линии А/Г- VII и генетически очень близки с изолятами, выделенными в Турции и Иране. На рис.4 представлена дендрограмма, отражающая положение эпизоотических изолятов штаммов вируса ящура А/Armenia/1, 2, 3, 4/11-01-2016 на филогенетическом древе.

Исследования, произведенные во Всемирной справочной лаборатории по ящуре (Пирбрайт, Великобритания) по определению антигенного родства показали, что используемые в РА противоящурные вакцины, имеющие антигены (А₂₂IRAQ; А IRAN 2005; А TUR 20/06) не могут обеспечить защиту животных от заражения изолятами генетической линии А/Г-VII. В связи с этим для профилактики ящура на территории Армении в 2016 году необходимо использовать вакцинные штаммы вируса ящура генетической линии АГ-VII.

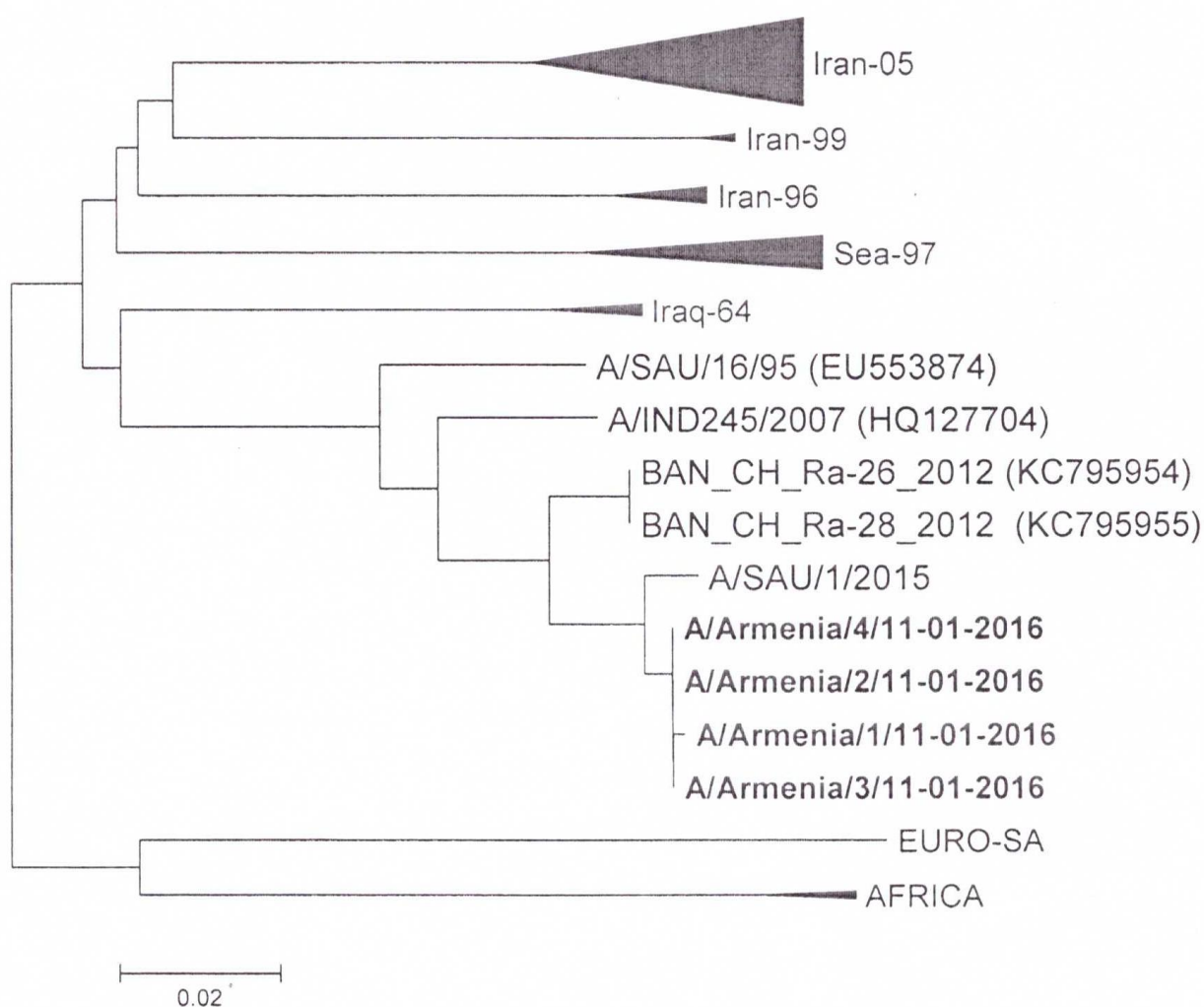


Рис.4. Положение изолятов вируса ящура типа А, выделенных в Армении в 2015г. на филогенетическом древе.

3.3.2. Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура типа О №1920/Армения/2002

В августе 2002 года в НЦЖВ поступил патматериал в виде афт от КРС, отобранный из Ашоцкого района Ширакской области Республики Армения. Из афт были приготовлены 10-33% суспензии, которые были исследованы в РСК, ИФА и ПЦР с последующим нуклеотидным секвенированием. Для изучения адаптационных свойств изолята и получения гипериммунной сыворотки на морских свинках были заражены первичные и перевиваемые линии культур клеток СП, ПСГК-30, IB-RS-2 и сделано три последовательных пассажа. Культуральные суспензии вируса также были исследованы на КС-активность и

специфичность в РСК. Титр инфекционности, рассчитанный по методу Рида и Менча, определяли в культуре клеток и выражали в Ig ТЦД₅₀/мл.

Методами лабораторной диагностики РСК, ИФА, ПЦР была подтверждена вспышка ящура в Армении (Ширакская область, 2002), вызванная вирусом ящура типа О.

Результаты типизации изолята из Ашоцкого района (Ширакская область) в РСК представлены в таблице 7.

Таблица 7

Определение типа вируса ящура в суспензии афтозного материала КРС

Сыворотки	Афтозная суспензия №1920 в разведениях				Контроль компонентов реакции			
	1:2	1:4	1:8	1:16	О ₁₉₄	А ₂₂	С ₅₆₄	Азия №48
О ₁₉₄	4	2	-	-	4	-	-	-
А ₂₂	-	-	-	-	-	4	-	-
С ₅₆₄	-	-	-	-	-	-	4	-
Азия №48	-	-	-	-	-	-	-	4
б/с	-	-	-	-	-	-	-	-
б/к	4	4	4	4	-	-	-	-

Анализируя данные таблицы 7, следует отметить, что выделенный изолят относится к вирусу ящура типа О.

В дальнейшем этот штамм был адаптирован к различным линиям культур клеток первично трипсинированной – СП и перевиваемым ПСГК-30 и ИВ-RS-2. Результаты этих исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8

Биологические свойства вируса ящура эпизоотического штамма О №1920/Армения/2002

Система репродукции вируса ящура	Время наступления ЦПД, часы	Уровень пассажа	Характеристика вируса	
			Активность в РСК	Титр инфекционности ТЦД ₅₀ /мл
СП	18	3	1:2	10 ^{-6,83}
ПСГК-30	18	3	1:4	10 ^{-7,55}
ИВ-RS-2	18	3	1:4	10 ^{-6,5}

Приведенные данные свидетельствуют о хорошей адаптационной активности вируса ящура типа О штамм №1920/Армения/2002 к использованным клеточным культурам.

В последствии на штамм №1920/Армения/2002, нами была получена гипериммунная противоящурная диагностическая сыворотка и концентрированные культуральные антигены. Результаты этих исследований приведены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9

Характеристика диагностической сыворотки, полученной на антиген из штамма вируса ящура О №1920/Армения/2002

Наименование препарата	Объем, мл	Активность в РСК				
		С гомологичным диагностикумом	С гетерологичными диагностикумами типа О			
			О №194	О №1618	О №1922	О №1923
Гипериммунная сыворотка	140	1:20	< 1:8	< 1:8	1:16	1:16

Полученные данные свидетельствуют о том, что гипериммунная сыворотка О №1920/Армения/2002 на гомологичный диагностикум имеет довольно высокий КС-титр в РСК (1:20), что нельзя сказать про гетерологичные диагностикумы других штаммов типа О.

Из данных таблицы 10 видно, что антигены полученные из культурального вируса ящура на ПСГК-30 и IB-RS-2, имеют довольно высокие КС-титры в РСК с гомологичной сывороткой, что нельзя сказать о титрах, полученных с гетерологичными сыворотками вируса ящура типа О.

Таблица 10

Характеристика диагностических антигенов из вируса ящура типа О №1920/Армения/2002, выращенного на разных культурах клеток

Наименование препарата	Кол-во серий	Объем, мл	Активность в РСК				
			С гомологичным диагностикумом	С гетерологичными диагностикумами типа О			
				О №194	О №1618	О №1922	О №1923
Культуральный антиген (ПСГК-30)	1	100	1:32	1:8	1:8	1:12	1:16
Культуральный антиген (IB-RS-2)	1	100	1:16	1:4	1:4	1:8	1:10

Было изучено антигенное родство полученного вируса с производственными штаммами вируса ящура и некоторыми эпизоотическими штаммами типа О, а также генетическое взаимоотношение с другими штаммами этого типа. Показано, что изолят О №1920/Армения/2002 (Ширакская область) в РСК отличается от производственных штаммов О№194, О №1618 и О №1736/Грузия/2000. Результаты этих исследований приведены в таблице 11.

Таблица 11

Антигенный спектр вируса ящура О №1920/Армения/2002 по данным РСК

Сравниваемые штаммы	Показатели		
	r ₁	r ₂	R%
О-№194	0,02	0,65	11
О-№1618	0,02	0,56	11
О-№1736 Грузия 2000	0,02	>1,0	14

Как видно из таблицы 11, штамм вируса ящура О №1920/Армения/2002 значительно отличается от производственных штаммов О-№194 и О-№1618, однако имеет незначительное антигенное родство со штаммами, выделенными в Грузии в 2000г.

Полученный штамм депонирован в коллекции микроорганизмов НЦЖВ МСХ РА г. Ереван и в ФГУ ВНИИЗЖ МСХ РФ г.Владимир под регистрационным наименованием “Штамм вируса ящура серологического типа О №1920/Армения/2002”.

Аналогичные результаты получены при исследовании двух проб афтозного материала крупного рогатого скота, отобранного на летнем пастбище “Кашатаг” Нагорно-Карабахской Республики (НКР) (экспертиза № 2041 от. 31.07.2007г.). В РСК и РН идентифицирован антиген вируса ящура типа О и методом ОТ-ПЦР амплицировали ДНК гена VP₁ изучаемых штаммов вируса ящура. На рис.5 представлена дендрограмма, отражающая положение эпизоотических изолятов О/NKR/1/2007 и О/NKR/2/2007 на филогенетическом древе вируса ящура типа О. Основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP₁ с VS вакцинного штамма.

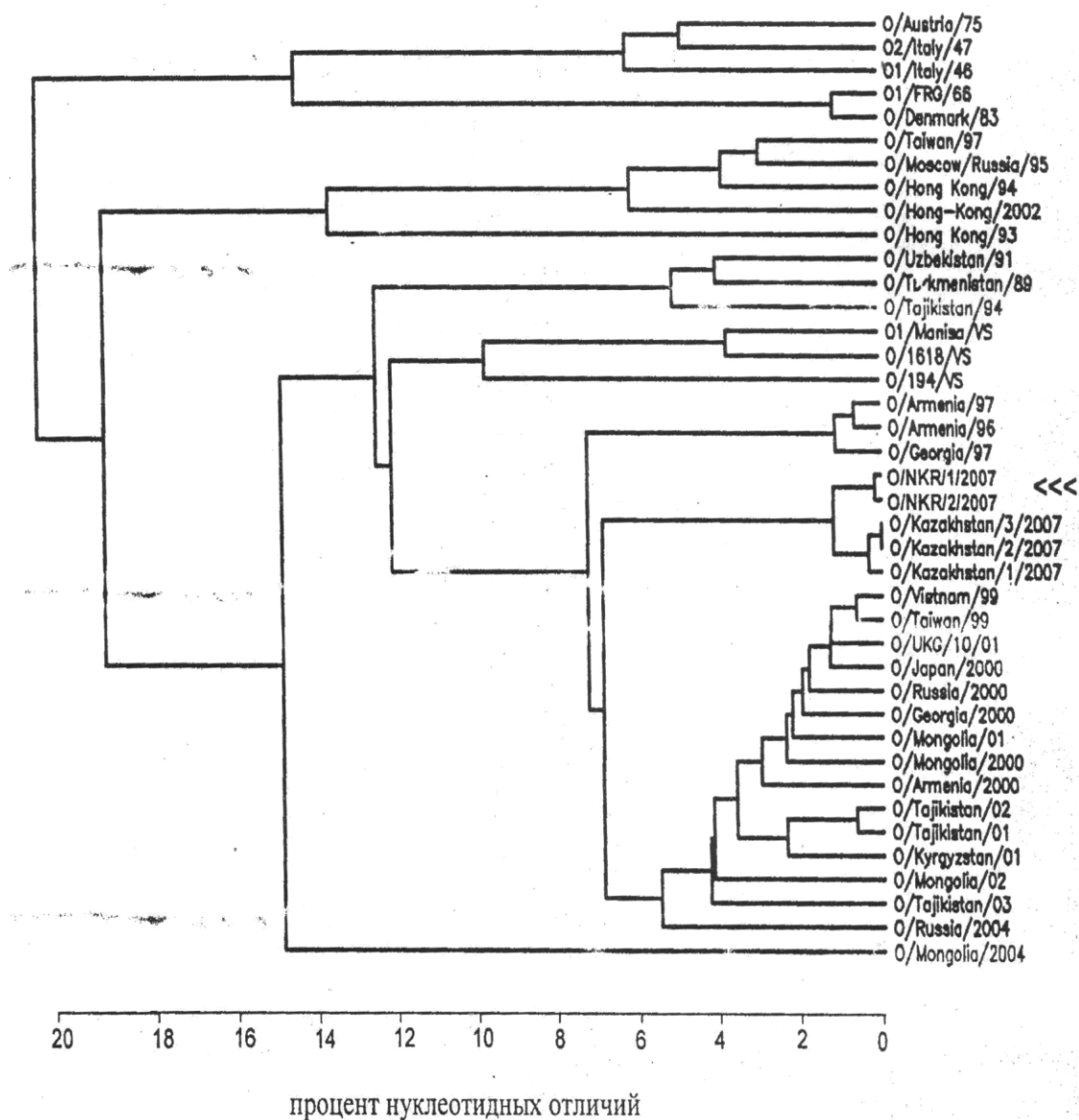


Рис.5. Дендрограмма, отражающая положение эпизоотических изолятов O/NKR/1/2007 и O/NKR/2/2007 на филогенетическом древе вируса ящура типа O.

Таким образом, проведенные иммунобиологические исследования штамма типа O №1920/Армения/2002 и №2041НКР2007 дают основание сделать вывод о том, что эти штаммы являются оригинальными, имеют одинаковые иммунобиологические свойства, отличаются от производственных штаммов (O №194, O №1618) и других эпизоотических штаммов O и могут быть рекомендованы в качестве нового производственного штамма типа O для лабораторной диагностики и специфической профилактики ящура в Армении.

3.3.3. Изучение иммунобиологических свойств эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1933 Армения/2000, выделенного в Армении

Проведено изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура типа Азия-1, выделенного в Армении – №1933 Армения/2000, в сравнении с производственным штаммом Азия-1 №48, применяемым в качестве вакцинного в РФ и Закавказье.

Антигенное родство исследуемых эпизоотических штаммов изучали в РСК и РН, которые ставили по общепринятым методам.

Изучаемые возбудители №1933 и №48 были адаптированы к первичным и перевиваемым культурам клеток. С этой целью было сделано по 3-5 пассажей, инфекционная активность вируса при этом колебалась в пределах 6,5-7,5 lg ТЦД₅₀/мл. В дальнейшем на этих клеточных культурах были получены концентрированные очищенные антигены, инактивированные димером этиленimina. Комплемент связывающий титр инактивированных антигенов составил 1:32-1:48. На данные антигены были получены штаммоспецифические противоящурные сыворотки от морских свинок, при этом титр полученных сывороток в РСК составил 1:40 и выше.

Методом ОТ-ПЦР амплифицировали ДНК гена VP₁ изучаемых штаммов вируса ящура (Рис.6).

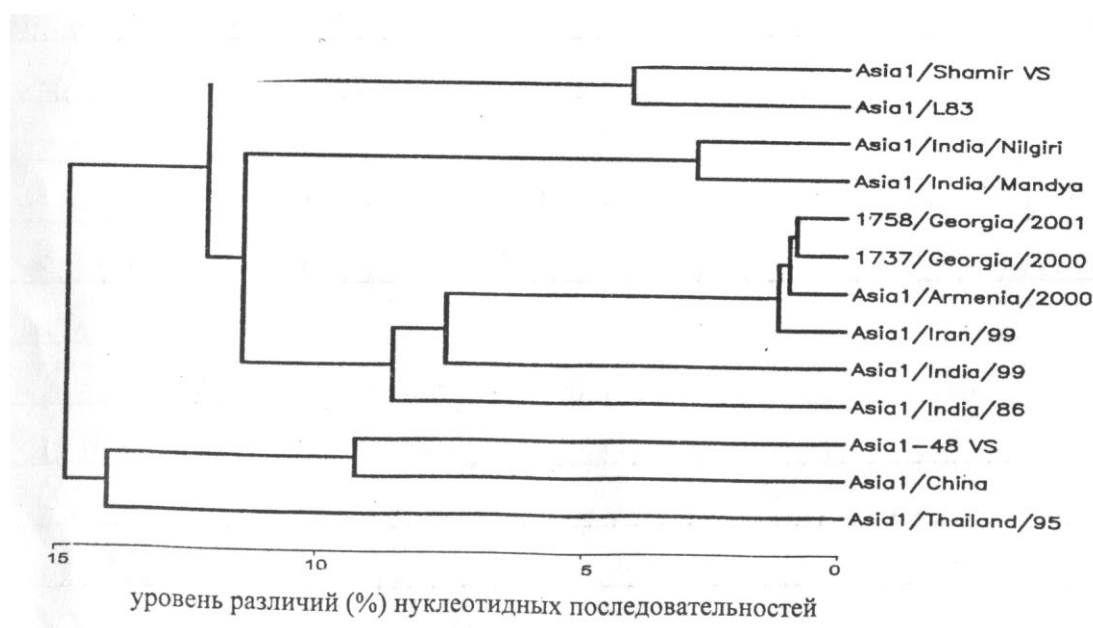


Рис.6. Дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения эпизоотических изолятов и вакцинных штаммов вируса ящура типа Азия-1, VS – вакцинный штамм.

Первичную структуру ампликонов определяли прямым секвенированием с использованием коммерческого набора DNA Cicle Sequencnog Sistem (Promega, USA). Сравнительный анализ установленных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета программ SEQPROGS. При построении дендрограммы были использованы также нуклеотидные последовательности эпизоотических зарубежных изолятов вируса ящура, взятые из информационной системы Genbank.

Определение двустороннего антигенного родства изученных эпизоотических штаммов вируса ящура проводили в РСК по 100%-му гемолизу с вычислением значения “R” по Архети и Хорсфалу и в РН в культуре клеток СП (таблица 12).

Таблица 12

Антигенный спектр штаммов ВЯ Азия-1 по данным РСК и РН

Сравниваемые штаммы типа Азия-1	РСК			РН		
	Показатели					
	r ₁	r ₂	R%	r ₁	r ₂	R%
№48 и №1933	1,0	0,14	37	0,72	0,5	60
№48 и №1737	1,0	0,11	33	0,74	0,43	56
№48 и №1758	1,0	0,12	35	0,7	0,46	57

Как видно из таблицы 12, антигенные свойства изучаемых эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1 по данным РСК несколько разнятся с результатами РН. Несовпадение данных РСК и РН объясняется тем, что в этих реакциях участвуют антитела разных классов. Тем не менее, изоляты ВЯ 2000-2001 гг. имеют отличия от производственного штамма Азия-1 №48.

Эпизоотические штаммы вируса ящура типа Азия-1 №1933 и производственный №48 были изучены в перекрестном испытании иммунитета на морских свинках. Результаты этих исследований представлены в таблице 13.

Перекрестное испытание иммуногенной активности штаммов ВЯ Азия-1

Вакцины из штаммов вируса ящура	ИМД ₅₀ штаммов ВЯ	
	№48	№1933
Азия-1 №48	0,11	0,67
Азия-1 №1933	0,23	0,12

Вакцину считают иммуногенной, если значение ИМД₅₀ для морских свинок не превышает 0,35. Из приведенных данных видно, что вакцина из производственного штамма Азия-1 №48 не защищает 60% животных при контрольном заражении их возбудителем №1933. Эти данные также согласуются с результатами, полученными в полевых условиях. Так, при применении в Армении вакцины на основе штамма ВЯ типа Азия-1 №48, привитые животные не имели достаточного уровня защиты против циркулирующих в то время штаммов этого типа и в некоторых случаях переболели.

Таким образом, как показывают приведенные в данном исследовании результаты, изучение антигенных и иммуногенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура и сравнение их с таковым вакцинных изолятов, является чрезвычайно важной задачей. При этом следует отметить, что изучение иммунобиологических свойств возбудителя следует проводить комплексно, т.е. с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей изучаемых изолятов, перекрестного заражения лабораторных животных, а также серологическими методами.

Так, с помощью данных комплексных методик было установлено, что изоляты вируса ящура типа Азия-1, выделенные в 2000-2001 гг. в Армении, значительно изменились по сравнению с вакцинным штаммом №48.

3.4. Культивирование изолятов ящура А-98, О-2002, О-НКР-2007, Азия-1-2000*3.4.1. Адаптация вируса ящура различного происхождения к перевиваемой линии клеток почек сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почек сирийского хомячка (ВНК-21).*

Изучение адаптационной способности вирусов ящура типов А, О, Азия-1, выделенных из афтозных материалов к культурам клеток СП, ПСГК-30, ВНК-21 проводили

последовательным прямым пассированием, в течение 5 пассажей. При этом учитывали цитопатическую активность и накопление КС-антигена.

Данные исследований представлены в таблице 14, откуда следует, что вирус ящура типов А, О, Азия-1, выделенный из афт больных ящуром животных, также легко адаптируется к культуре клеток ПСГК-30 и ВНК-21 методом прямых пассажей, как и к первичной культуре клеток СП. Уже с первого пассажа (100% случаев) вирус размножается с проявлением четкого, однотипного, характерного для вируса ящура цитопатического эффекта (ЦПД), поражающего 90-100% клеток монослоя к 18-36 часам культивирования, накапливаясь в высоких титрах (до 5,5-7,0 lg. ТЦД₅₀/мл). Причем накопление вируса и КС-антигена в перевиваемой линии ПСГК-30 и ВНК-21 было всегда несколько выше (0,3-0,5 lg. ТЦД₅₀/мл), чем в первичной культуре клеток СП. Однако, на первом пассаже в культуре клеток ПСГК-30 отмечены некоторые отличия в адаптационной способности вируса, зависящие от его типовой принадлежности. Так, вирус ящура типа О размножается в ней без предварительной адаптации. Накопление вируса и КС-антигена в данной культуре к 18 часам культивирования достигает 7,0-7,6 lg.ТЦД₅₀/мл и 1:2 соответственно, и удерживается на этом уровне до пятого пассажа. Это указывает на отсутствие необходимости в его адаптации при работе с данной культурой. Для полной же адаптации вируса ящура типов А и Азия-1 к перевиваемой линии клеток ПСГК-30 и ВНК-21 необходимо проведение не менее 3-4 последовательных прямых пассажей в данных культурах, в результате чего инфекционная активность вируса повышается в среднем на 1,0 lg. ТЦД₅₀/мл. Причем, инфекционная и КС-активности вируса ящура типа Азия-1 в этих культурах значительно выше (до 6,2-7,0) lg. ТЦД₅₀/мл, БОЕ/мл и КС-антигена – до 1:2, $P \pm \leq 0,005$, чем в первичной культуре клеток СП, в которой инфекционная активность вируса с пассажами снижается до 4,8±0,12 lgТЦД₅₀/мл, а КС-антиген обнаруживается только в неразведенном вирусосодержащем материале.

Кроме того, для вируса ящура типа Азия-1 характерно формирование в клетках ПСГК-30 однородных бляшек более крупных размеров (до 2,0±0,04мм), чем у других типов данного вируса.

Таблица 14

Адаптационная способность афтозных материалов вируса ящура типов А, О, Азия-1 в культурах клеток ПСГК-30, ВНК-21 и СП

Тип вируса ящура	Пассаж в культурах	Вид культуры для пассажа	Цитопатическая активность вируса в этих культурах	Накопление вируса при титровании в культурах клеток										КС антиген (в 0,4 мл)
				СП		ПСГК-30		ВНК-21						
				В Ig 10	БОЕ/мл	В Ig 10	БОЕ/мл	В Ig 10	БОЕ/мл					
А-1998/Армения	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II	II		
													СП	6,2±0,13
	1	1	ПСГК-30	++++к 24ч	6,6±0,11	7,1±0,12	5,4±0,14	6,0±0,11	5,4±0,14	6,0±0,11	6,0±0,11	1:2		
													ВНК-21	6,4±0,12
	3	3	СП	++++к 18ч	5,7±0,9	5,1±0,11	5,2±0,09	5,8±0,07	6,7±0,12	5,8±0,07	6,2±0,13	1:2		
													ПСГК-30	5,7±0,11
	5	5	СП	++++к 18ч	6,0±0,15	6,0±0,13	6,0±0,13	6,0±0,13	6,0±0,13	6,0±0,13	6,0±0,13	ц		
													ПСГК-30	6,0±0,1
	1	1	ВНК-21	++++к 24ч	6,0±0,1	6,1±0,12	6,1±0,12	6,1±0,12	6,1±0,12	6,0±0,1	6,0±0,1	1:2		
													СП	6,2±0,15
О-2002 О-НКР 2007	1	ПСГК-30	++++к 18ч	7,0±0,11	8,2±0,13	7,6±0,12	8,7±0,16	7,1±0,11	7,9±0,11	7,9±0,11	1:2			
												ВНК-21	6,9±0,08	7,4±0,13
	3	3	СП	++++к 18ч	6,4±0,14	6,6±0,11	6,6±0,11	6,6±0,11	6,4±0,11	6,4±0,11	6,4±0,11	ц		
													ПСГК-30	6,2±0,09
3	3	ВНК-21	++++к 18ч	6,0±0,1	7,1±0,11	7,1±0,11	7,1±0,11	7,1±0,11	7,0±0,05	7,0±0,05	1:2			

Таблица 14 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Азия-1	5	СП	++++ к 18ч	6,5±0,13		6,7±0,09		6,6±0,11		ц	
		ПСГК-30	++++ к 18ч	7,1±0,11	7,9±0,11	7,9±0,12	8,5±0,14	7,9±0,12	8,5±0,14	1:2	
	ВНК-21	++++ к 18ч	7,0±0,05		7,6±0,12		7,6±0,12			1:2	
	1	СП	++++ к 24ч	7,0±0,05		5,0±0,11			4,7±0,1		ц
		ПСГК-30	++++ к 36ч	7,0±0,14	6,2±0,11	6,2±0,12	6,5±0,1	6,5±0,1	6,5±0,07	6,3±0,13	1:2
	ВНК-21	++++ к 36ч	7,0±0,11		6,2±0,09		6,2±0,09		6,5±0,11		1:2
3	СП		++++ к 24ч	4,7±0,1		2,5±0,07		2,5±0,07		ц	
											ПСГК-30
	ВНК-21	++++ к 36ч	6,3±0,13		6,3±0,13		6,3±0,13		6,2±0,12		1:2
	5	СП	++++ к 18ч	4,8±0,12			2,7±0,1		2,7±0,1		ц
ПСГК-30		++++ к 18ч	6,3±0,13	6,8±0,1	6,3±0,12	7,0±0,14	7,0±0,14	6,7±0,09	7,0±0,14	1:4	
ВНК-21	++++ к 18ч	6,2±0,12		6,2±0,09		6,2±0,09		6,6±0,11		1:4	

Примечание: +++ – специфическое поражение клеток на 90-100%

н/ц – не улавливается

ц – в неразведенном материале

Высокая чувствительность клеток ПСГК-30 к вирусу ящура типа Азия-1 указывает на возможность использования ее в качестве индикаторной системы для выделения и идентификации вируса в очагах инфекции.

Таким образом, перевиваемая линия клеток ПСГК-30 по чувствительности к адаптированному в ней вирусу ящура трех типов не ниже первичной культуры клеток СП, перевиваемой культуры клеток ВНК-21, и значительно превосходит отмеченных культур по накоплению КС-антигена, поэтому дальнейшие исследования проводили только на перевиваемых культурах клеток ПСГК-30.

Повышение цитопатической активности вируса ящура трех типов в процессе адаптации в культурах клеток ПСГК-30 подтверждается бляшкообразующей способностью вируса в данной культуре (таблица 15).

Таблица 15

**Бляшкообразующая способность афтозных материалов (n=3)
вируса ящура при пассажах в культуре клеток ПСГК-30**

Тип вируса ящура	Пассаж в культурах	Бляшкообразующая способность афтозных материалов ВЯ при пассажах в культуре клеток ПСГК-30					
		СП			ПСГК-30		
		Накопление в Ig.БОЕ/мл	Средний размер бляшек, мм	% крупных бляшек	Накопление в Ig. БОЕ/мл	Средний размер бляшек, мм	% крупных бляшек
А-Армения/98	1	7,1±0,12	4,7±0,05	47	6,0±0,11	8,0±0,07	95
	3	6,3±0,13	2,4±0,01	3	6,7±0,12	7,4±0,03	90
	5	7,3±0,11	4,6±0,06	50	7,2±0,15	6,5±0,05	83
О-НКР 2007	1	8,2±0,13	2,0±0,02	0,3	8,7±0,16	4,3±0,03	40
	3	6,4±0,14	1,6±0,01	0,1	7,7±0,13	3,4±0,01	20
	5	7,9±0,11	2,2±0,02	0,5	8,5±0,14	3,9±0,02	40
Азия-1 2000	1	6,2±0,11	5,2±0,04	70	6,5±0,1	9,2±0,03	97
	3	6,3±0,13	2,6±0,01	0	6,5±0,12	12,0±0,04	100
	5	6,8±0,1	4,2±0,01	50	7,0±0,14	12,0±0,02	100

Примечание: средний размер рассчитан при подсчете не менее 100 бляшек

Все три типа вируса ящура с первого пассажа в культуре клеток ПСГК-30 формируют четкие, крупные бляшки с ровными краями. В основном все вирусные популяции афтозных материалов были крупнобляшечными, в то время как в первичной культуре СП преобладали мелкие бляшки. Средние размеры бляшек в данной культуре через 72 часа культивирования вируса составляли для типов О – $4,3 \pm 0,03$ мм, А – $8,0 \pm 0,07$ мм, Азия-1 – $9,2 \pm 0,03$ мм, которые всегда в 1,5 раза крупнее, чем в первичной культуре клеток СП.

В процессе адаптации вируса ящура разных типов в культуре клеток ПСГК-30 отмечено изменение как размера, так и соотношения крупных и мелких бляшек в вирусной популяции. Если для типа О характерна стабилизация вирусной популяции по размеру и содержанию крупных бляшек, то для типа Азия-1 с пассажами отмечается не только увеличение их размера (до 12,0 мм), но и их однородность – все они крупных размеров. Для типа А, вместе с уменьшением размера бляшек, увеличивается количество мелких бляшек, хотя цитопатическая активность вируса с пассажами усиливается.

3.4.2. Множественность заражения

Для стандартизации условий проведения исследований по накоплению вируса и КС-антигена, а также по изучению чувствительности культур клеток ПСГК-30, использовали вирус ящура, прошедший по 3-5 пассажей в данной культуре.

В первоначальных исследованиях изучали влияние множественности инфицирования (М) на динамику накопления вируса и КС-антигена в перевиваемой линии клеток ПСГК-30. Монослойные культуры клеток ПСГК-30 инфицировали $M=0,1$ ТЦД₅₀/клетку, $0,01$ ТЦД₅₀/клетку, $0,001$ ТЦД₅₀/клетку. Через 24, 48 и 72 часа культивирования при 37⁰С отбирали пробы для определения инфекционной и КС-активности вируса ящура. Результаты исследований представлены в таблице 16.

Из таблицы видно, что величина заражающей дозы не оказывала существенного влияния на инфекционную и комплемент-связывающую активность вируса ящура обоих типов ($P_t > 0,2$), хотя более высокое накопление отмечалось при $M=0,1-0,01$ ТЦД₅₀/клетку. Отмечена зависимость в сроках максимального накопления вируса и КС-антигена. Более высокая инфекционная активность отмечалась к 24 часам культивирования, при поражении клеток монослоя на 90-100%, тогда, как максимальное накопление КС-антигена – только к 48

часам, когда инфекционная активность снижалась более чем на 0,7 lg ТЦД₅₀/мл ($P_t < 0,025$), причем культуральный КС-антиген типа А обладал более выраженной активностью по сравнению с типом О.

Таблица 16

Влияние множественности инфицирования на динамику накопления инфекционной и КС-активности вируса ящура типов А и О в культуре клеток ПСГК-30 (n=5)

Продолжительность культивирования, час	Множественность инфицирования ТЦД ₅₀ /кл	Тип вируса ящура			
		А		О	
		Накопление			
		Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /мл	КС-активность, 0,4мл	Инфекционная активность, lg. ТЦД ₅₀ /мл	КС-активность, 0,4мл
24	0,1	6,38±0,25	1:4	7,24±0,15	1:2
	0,01	6,58±0,31	1:5	7,21±0,11	Цельн.
	0,001	5,86±0,17	1:4	7,11±0,21	Цельн.
48	0,1	5,41±0,16	1:6	6,45±0,25	1:2
	0,01	5,36±0,21	1:6	6,65±0,23	1:2
	0,001	5,64±0,23	1:4	6,57±0,19	Цельн.
72	0,1	4,11±0,13	1:6	5,56±0,16	Ц
	0,01	4,23±0,17	1:4	5,75±0,11	1:2
	0,001	4,21±0,11	1:4	5,68±0,17	1:2

В дальнейших опытах по изучению влияния различных факторов на накопление вируса ящура, инфицирование проводили при множественности 0,1-0,01 ТЦД₅₀/кл.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что высокая чувствительность к вирусу ящура перевиваемой линии клеток ПСГК-30, не уступающая по этому признаку первичной культуре клеток СП, способность размножения в ней вируса с явно выраженным цитопатическим эффектом, поражающим 100% клеток монослоя, образование четких бляшек, дает возможность использовать перевиваемую линию клеток ПСГК-30 как индикаторную систему для выделения и идентификации вируса, его титрования по ЦПД и методом бляшек, для генетических исследований и других целей, вместо первичной культуры клеток СП. Поэтому все дальнейшие исследования по отработке условий культивирования, с

целью повышения чувствительности клеток ПСГК-30 к вирусу ящура проводились только с использованием данной культуры клеток.

3.4.3. Сравнительное изучение чувствительности новых культур клеток к вирусу ящура.

В последние годы в НЦОАРБПП для выделения и адаптации вируса ящура чаще используют культуры клеток (КК) свиного происхождения, такие как СП, IB-RS-2, ПСГК-30 и универсальную перевиваемую клеточную линию ВНК-21. Ранее для этих целей применяли первично-трипсинизированную КК бычьей почки и ее субкультуру.

По мере расширения и углубления вирусологических исследований возрастает интерес к использованию новых малоизученных клеточных культур, например таких, как высокочувствительная к вирусам крупного рогатого скота линия диплоидных клеток эпителиоподобного типа, полученная из коронарных сосудов плода коровы, в институте экспериментальной ветеринарии РАСХН.

Первичную КК почки поросенка (СП), субкультуру почки теленка (ПТ), перевиваемые линии клеток почки свиньи (IB-RS-2), бычьей почки (МДБК), почки сирийского хомячка (ВНК-21) и коронарных сосудов теленка (КСТ) получали из музея клеточных культур ВНИИЗЖ.

Для заражения КК использовали эпизоотические изоляты ВЯ типа О-НКР 2007, Армения 2002, а также образцы вируса типов А₂₂ и О₁, адаптированные путем длительных пассажей к организмам овец, мышей и крольчат.

Во флаконы объемом 50см³ со сформировавшимся монослоем вносили свежую порцию поддерживающей среды без сыворотки и вирусную суспензию неадаптированных КК штаммов с таким расчетом, чтобы множественность заражения составляла для всех штаммов 0,1-1,0 ТЦД₅₀/клетку. Вирус культивировали при 37⁰С до появления признаков ЦПД. Максимально проводили не более 6 пассажей. При отсутствии ЦПД в течение 96-120 часов делали “слепые” пассажи: максимально делали 3 “слепых” пассажа. Адаптированным считали вирус, вызывающий 80-100% ЦПД в течение 18-24 часов.

Инфекционную активность вируса определяли в КК СП и выражали в Ig ТЦД₅₀/мл. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 17.

**Цитопатическая активность вируса ящура типов А и О различных пассажных уровней,
выращенного в различных клеточных культурах**

ВЯ	СП		ВНК		IB-RS-2		КСТ		МДВК		ПТ	
	пасс ¹	титр ²	пасс	титр	пасс	титр	пасс	титр	пасс	титр	пасс	титр
О ₁ №194 лапинизир.	1	4,0-6,5	5	>5,5	3	3,75	2	6,0	3	н/и	3	1,5
				6,75		6,75		6,0				н/и
О ₁ №194 овечий	2	>5,5	>4	4,0	5	4,25	3	>6,5	3	1,25	3	1,75
		5,0		>7,25		>7,25		7,5		0		0,25
О ₁ №194 мышинный	>5	2,0	>5	>5,5	3	2,25	4	2,5	3	0,75	3	1,75
		2,0		4,5		5,75		4,75		0		0
О ₁ №1685 Московский	3	4,33	4	5,5	5	3,25	2	6,25	3	2,75	3	2,0
		3,75		6,75		6,5		7,0		0		0
О ₁ 2002 Армения	>6	3,5	>6	2,5	5	5,25	6	3,25	3	1,5	3	>4,5
		5,25		2,0		6,75		5,75		0		0
О ₁ НКР 2007	4	0,75	4	3,75	4	2,25	4	3,25	3	0	3	2,5
		6,25		4,0		7,25		6,25		0		0
А ₂₂ овечий	3	6,25	4	4,75	4	>5,5	2	6,5	3	0	3	>4,5
		7,0		7,0		7,25		6,75		0		0

Примечания:

¹ – число пассажей, необходимых для адаптации образцов вируса ящура к культурам клеток

² – титр вируса в первом и последнем пассажах;

н/и – не исследовали

Было установлено, что в клеточных культурах СП и ВНК адаптация вируса наступала в течение 1-4 и 4-5 пассажей, соответственно. Исключение составляли образцы вируса О₁ Армения 2002 и О₁ №194 мышинный, у которых ЦПД в 5-6 пассажах наступало не ранее 48-96 часов после заражения, а титр инфекционности в ходе пассирования не изменялся.

В КК IB-RS-2 все испытуемые образцы ВЯ к 3-5 пассажам вызывали 100% ЦПД через 24 часа после заражения с достаточно высоким уровнем накопления вируса (5,75-7,5 lg ТЦД₅₀/мл).

После проведения трех “слепых” пассажей испытуемых образцов в КК МДВК нами был сделан вывод о нечувствительности данной культуры к ВЯ.

Используемая нами в опытах субкультура ПТ была морфологически неоднородна. При преобладании фибробластоподобных клеток ЦПД не отмечали. В результате пассирования изучаемых изолятов титры вируса снижались со значения 4,5 lg ТЦД₅₀/мл до 0, в то время как в культуре клеток эпителиального типа, зараженной культуральным ВЯ А₂₂ №550, ЦПД наблюдали в первые сутки после инфицирования. При этом титр инфекционной активности составлял 6,0 lg ТЦД₅₀/мл.

Морфологические изменения, развивающиеся в культуре клеток КСТ под действием вируса, наступали раньше, чем в других используемых нами клеточных линиях. Полное разрушение монослоя с отслоением пораженных клеток от стекла происходило на 2-6 пассаже через сутки после заражения, и вирус накапливался в титрах 2,5-6,5 и 5,75-7,5 lg ТЦД₅₀/мл в образцах первых и заключительных пассажей, соответственно.

Таким образом, при изучении чувствительности культур клеток различного происхождения к вирусу ящура было показано, что перевиваемая КК МДВК оказалась непригодна для адаптации и выделения ВЯ. Отрицательные результаты, полученные нами при культивировании вируса на субкультуре ПТ, вероятно связаны с нарушениями условий ее выращивания, что, может привести к получению нечувствительной линии клеток. Из трех испытанных нами клеточных линий бычьего происхождения наиболее активное размножение образцов вируса отмечено в КК КСТ. Следовательно, эта линия может быть рекомендована для использования в вирусологических исследованиях ВЯ.

3.5. Получение и усовершенствование технологии изготовления экспериментальной серии вакцин против ящура

При изготовлении противоящурных вакцин использовали различные методы инактивации вируса. Термин “инактивация” в этом аспекте означает утрату вирусом способности к репродукции при сохранении иммуногенных и антигенных свойств.

Формальдегид, который многие годы использовался в качестве инактиванта вируса ящура, уже не применяется, так как имеет ряд недостатков. В настоящее время наиболее

широкое использование для инактивации вируса ящура нашли производные азиридина и, в частности, аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ) и аминометилэтиленимин (АМЭИ). Инактивацию проводили по методике И.А.Улупова, В.В.Михалишина и др. [123].

На примере вируса ящура, адаптированного к организму крольчат 2-3-дневного возраста и к суспензионной культуре клеток ВНК-21, показана вирулицидная активность олигомера 2-аминоэтилэтиленимина (димера этиленимина, АЭЭИ). Начальным этапом оценки кандидатов в инактиванты было определение их концентрации в вирусной суспензии, обеспечивающей получение авирулентной суспензии при заданных параметрах процесса инактивации (температура, концентрация, длительность) и расчет K_{50} . Снятие кривой снижения титра инфекционности, при выбранных параметрах процесса инактивации позволило определить уровень безопасности вирусосодержащей суспензии, предназначенной для получения вакцины. Определение влияния АЭЭИ на иммуногенность вируса как в процессе инактивации, так и в процессе хранения, проведено путем увеличения концентрации инактиванта и температуры хранения вакцины.

Вирулоцидность, стабильность, минимальное повреждение 146 S частиц основного иммуногенного компонента вируса указывает на то, что АЭЭИ имеет ряд преимуществ перед другими азиридинами.

По данным Всемирной справочной лаборатории (Пирбрайт) в мире вновь выделенные изоляты (А, О, Азия-1) в значительной степени отличаются от существующих вакцинных штаммов вируса ящура А₂₂-№550, О₁-№194 и Азия-1 №48, чем объяснялись прорывы иммунитета у вакцинированных животных. На экстренных совещаниях специалистов, проведенных под эгидой ФАО и МЭБ, была выражена срочная необходимость разработки противоящурной вакцины из новых вариантов. Поэтому, совместно с ВНИИЗЖ начали изучать патологические материалы, которые доставляли в ВНИИЗЖ, где и были выделены штаммы вируса ящура, получившие название Армения/98, О-Армения-2002 и Азия-1 Армения 2000. После подтверждения их отличия от вируса ящура А₂₂, О₁ и Азия-1, была проведена экспериментальная работа по подготовке производственного штамма и изготовлению противоящурной вакцины [319, 320].

Для изготовления вакцины использовали эпизоотические штаммы вируса ящура (А-Армения/98, О-2002, Азия-1-2000), прошедшие не более 10 пассажей, с инфекционным титром не ниже, чем $10^{7,5}$ ЛД₅₀/мл для культурального вируса и обладающие комплементсвязывающими свойствами в РСК.

1. Компоненты вакцины:

- а) культуральный вирус, выращенный в клетках ВНК-21
- б) аммиачный буферный раствор в соотношении 1:10, т.е. на 10 кг вируса 100 л раствора.

Культуральный вирус после размораживания измельчали и эмульгировали в коллоидных мельницах марки ГУ-8 – ГУ-10 с зазором ножей: на первой – “0,5”, на второй и последующей – “00”, с одновременной подачей аммиачного буферного раствора на вторую мельницу. Вирусодержащую суспензию по закрытой системе трубопроводов подавали в реактор.

После измельчения (размола) вирусодержащего материала в реактор передавливали оставшийся аммиачный буфер до получения 10% вирусодержащей суспензии. Затем сливной потрубок реактора соединяли через водяной насос со второй коллоидной мельницей, а последнюю мельницу подсоединяли ко входному потрубку этого реактора.

С помощью насоса суспензию подавали на три-четыре последовательно соединенные коллоидные мельницы марки ГУ-8 или ГУ-10 с зазором ножей “00” и проводили дополнительный размол суспензии 1 час. При размоле реакторную мешалку отключали.

После размола брали пробу суспензии для определения рН, который должен быть в пределах 7,4-7,8. При необходимости рН суспензии корректировали 5М раствором аммиака.

2. Очистка вирусодержащей суспензии

После дополнительного измельчения вирусодержащей суспензии при постоянной работе мешалки, добавляли раствор флокулянтов в количестве 0,3-0,1% или 0,05-0,2% основного вещества, соответственно. Диапазон концентраций обусловлен различной активностью флокулянтов, зависящей от вида и молекулярной массы.

Суспензию с флокулянтом перемешивали в реакторе в течение 30 мин. с целью образования соединений флокулянтов с балластными белками.

Не удаляя из суспензии флокулированные белки, приступали к экстрагированию растворителем ПЭИ и ПЭА. Для этого в суспензию вносили 5% объемных хлороформа и эмульгировали при помощи водяного насоса и коллоидной мельницы марки ГУ-8 с зазором ножей “3”. Эмульгирование проводили в замкнутой системе реактор-насос-мельница-реактор при температуре 2-8°С и постоянной работе мешалки.

Полноту экстрагирования контролировали по снижению интенсивности окраски суспензии, так как растворенное соединение флокулянт-белок придает суспензии ярко-красный цвет. Эмульгирование прекращали после обесцвечивания суспензии. Обесцвеченную суспензию сепарировали на трех последовательно соединенных установках Альфа-Лаваль двукратно. Первое сепарирование проводили с подачей суспензии 750-800 л/ч и с разгрузкой первого сепаратора через каждые 7-9 минут, второго – через 40-50 минут и третьего – через 60-80 мин. После первого сепарирования суспензию по закрытой системе трубопроводов подавали в реактор.

Второе сепарирование проводили с подачей суспензии 1000-1200 л/ч с разгрузкой первого сепаратора через каждые 40-50 минут, второго и третьего – в конце сепарирования.

Очищенную суспензию подавали в стерильный раствор. Суспензия должна иметь прозрачность не ниже 60% при проверке 20 мм слоя суспензии на ФЭК против дисциплированной воды при красном светофильтре. После перемешивания из реактора брали пробу вирусной суспензии для контроля рН, типоспецифичности, количества общего белка и содержания 146 компонента. При необходимости рН вирусной суспензии доводили 5М раствором аммиака до 7,5-7,8.

Вирусодержащая суспензия должна обладать характеристиками, указанными в таблице 18.

Вирусная суспензия, удовлетворяющая этим требованиям, использовалась в дальнейшей работе для изготовления противоящурной вакцины. Если полученная, очищенная вирусодержащая не отвечала одному из требований, то ее выбраковывали.

Температура вирусодержащей суспензии на всех стадиях очистки поддерживалась в пределах 2-10°С, а рН – в пределах 7,5-7,8.

**Требования к суспензии культурального вируса ящура, приготовленной
для изготовления вакцин**

№	Показатели	Ед. изм.	Необходимые препараты		
			Типа А	Типа О	Типа Азия-1
1	Количество общего вирусного белка	мкг/мл	Не ниже 1,2	Не ниже 1,0	1,2
2	Кол-во 146 компонента	мкг/мл	Не ниже 0,7	Не ниже 0,5	0,6
3	Типоспецификация	Типовая принадл.	Типоспецифична		
4	Кол-во общего белка	Мг %	50-90	50-90	50-90

3. Инактивация вируса

В качестве инактивантов вируса ящура использовали АЭЭИ.

4. Изготовление моновалентных вакцин

4.1. Состав моновалентной вакцины

В состав инактивированной моновалентной вакцины входят:

1. 146 компонент вируса ящура

тип А – вариант А-Армения 98 – не менее 3,0 мкг/мл

тип О – вариант О-Армения-2002 и НКР-2007 – не менее 3,0 мкг/мл

тип Азия-1 – вариант Азия-1 2000 – не менее 3,0 мкг/мл

2. Сорбент (по сухому остатку) – 1,5-2,0%

3. Сапонин в зависимости от адъювантной активности (по сухому остатку) – 0,1-0,2%

4. Гидролизат (по сухому остатку) – 0,15-0,2%

5. Тимерсал (по сухому остатку) – 0,01-0,2%

6. Хлороформ – 0,2%

В качестве сорбентов в вакцине использовали коллоидные растворы ГОА, или Саригюхского бентонита, аэросила марки А-300 или аэрогель.

Прежде чем определить объем адсорбента, который необходимо добавить к инактивированному вирусному антигену, высчитывали объем будущей вакцины.

На основании объема полученной суспензии, количества 146 компонента в 1 мл инактивированной суспензии, объема дозы и требуемого количества 146 компонента в прививной дозе определяли объем будущей вакцины по формуле 1:

$$Y = \frac{Y_2 \cdot Y_3 \cdot \Pi_1}{\Pi_2} = \text{л, где:}$$

Y – объем вакцины, л

Y_2 – объем инактивированной суспензии, л

Y_3 – объем прививной дозы вакцины

Π_1 – количество 146 компонента в 1 мкг инактивированной суспензии

Π_2 – количество 146 компонента (мкг) в прививной дозе вакцины (5 мл).

Концентрирование антигена проводили адсорбентом, объем которого определяли по формуле 2:

$$Y_{\text{адсорб}} = \frac{Y_{\text{вакц}} \cdot 2}{3} = \text{л адсорбента, где}$$

$Y_{\text{адсорб}}$ – объем 3% суспензии адсорбента в литрах,

$Y_{\text{вакц}}$ – объем вакцины, рассчитанный по заданному количеству 146 компонента в прививной дозе вакцин,

2 – процентная концентрация адсорбента в вакцине по сухому остатку,

3 – исходная концентрация раствора адсорбента в процентах.

Стерильную суспензию адсорбента по закрытой системе через две коллоидные мельницы марки ГУ-10 с зазором ножей “00” мм подавали в реактор с вирусной суспензией при постоянной работе мешалки. После добавления сорбента брали пробу для определения рН. При необходимости рН суспензии доводили 5М раствором уксусной кислоты или аммиака до 7,4-7,6.

Смесь суспензии с адсорбентом оставляли на 2-4 сутки при температуре 2-6⁰С для отстоя сорбированного антигена до уровня, обеспечивающего слив расчетного количества

надосадочной жидкости. В период отстоя мешалку не включали. Затем, с помощью сифона из реактора отсасывали надосадочную жидкость до расчетного объема вакцины. Надосадочную жидкость обеззараживали при температуре 110-120°C в течение 1 часа. После декантации оставшийся в реакторе сорбированный антиген (полуфабрикат вакцины) интенсивно перемешивали и брали пробу для определения рН и авирулентности препарата. При необходимости рН инактивированного антигена доводили 5М раствором уксусной кислоты до 7.4-7.6 (Концентрирование антигена проводили адсорбентом, объем которого определяли по формуле 2).

Контроль авирулентности проводили на мышатах-сосунах. Для составления вакцины использовали авирулентный полуфабрикат.

Для составления объединенной серии вакцины инактивированный полуфабрикат, после корректировки объема, из реактора по закрытой стерильной системе трубопроводов подавали в реактор-накопитель, где объединяли несколько партий полуфабрикатов, до получения требуемого объема в срок не более 2 месяцев. После объединения полуфабрикатов вакцины в одну серию, в реактор с инактивированным препаратом, при постоянной работе мешалки, медленно добавляли 1-2% (в зависимости от адъювантной активности) 10%-го раствора сапонины, 2% десятипроцентного раствора гидролизата или гистидина, 0,2% (объемных) хлороформа и 0,2% десятипроцентного раствора тиомерсала.

После перемешивания в течение 1 часа, определяли рН вакцины и, при необходимости, доводили до 7,5-7,7.

Затем реактор опечатывали и вакцину выдерживали при температуре 2-6°C в течение 120 часов при периодическом помешивании (3 мин. через 5-6 часов).

После 120 часовой выдержки из реактора отбирали среднюю пробу вакцины, которую исследовали на иммуногенную активность на морских свинках.

Для составления серии поливалентной вакцины использовали инактивированные моновалентные препараты, 50% иммунизирующая доза которых для морских свинок меньше или равна 0,1 мл. Инактивированные моновалентные препараты смешивали в соотношении 1:1. С этой целью объединенные серии моновалентных вакцин из реакторов закрытой

стерильной системы трубопроводов подавали в реактор, где объединяли моновалентные препараты до получения требуемого объема поливалентной вакцины.

После перемешивания в течение 1 часа, определяли рН вакцины и при необходимости, доводили его до 7,5-7,7.

Затем реактор опечатывали и вакцину выдерживали при температуре 2-6°C в течение 48 часов при периодическом перемешивании (3 мин. через 5-6 часов).

3.5.1 Изучение авирулентности, безвредности и иммунологической эффективности приготовленных вакцин из вирусов ящура штамма Армения/98

Из вируса штамма Армения/98, адаптированного к суспензионной культуре клеток ВНК-21, приготовили Гоа-сапонин вакцину, содержащую 2,88мкг/мл 146+75 S компонентов вируса ящура. В качестве референс-вакцины была изготовлена ГОА-сапонин вакцина из вируса ящура А₂₂ №550, содержащая 5,0мкг/мл 146+75 S компонентов.

В опыте находились 19 бычков кавказской бурой породы массой 300-350 кг. Животных разделили на три подопытные группы и одна группа (2гол.) служила контролем. На животных первой группы (5гол.) проверяли вакцину на авирулентность и безвредность. Проверку авирулентности проводили путем введения средней пробы вакцины в подслизистую языка методом тонелирования в 20 точек по 0,1 мл. Наблюдение за привитыми животными проводили в течение 10 дней.

С целью проверки безвредности вакцину вводили подкожно в область средней трети шеи в дозе 10мл. У животных в течение 5 дней измеряли температуру тела и наблюдали за местной реакцией. Температура тела у животных через 12 часов повысилась до 40,2-40,5°C и удерживалась на этом уровне одни сутки. На месте введения были отмечены незначительные инфильтраты, которые рассасывались на 3-4 день. Проверенная вакцина была авирулентна и безвредна.

Вторую группу животных (6гол.) вакцинировали вакциной из вируса Армения/98, разведенной в 7 раз безадьювантным буферным раствором. Прививная доза вакцины содержала 0,82 мкг 146+75 S компонентов вируса в 2 мл.

Иммуногенный статус животных оценивали, исследуя сыворотки крови, полученные перед вакцинацией и через 20 дней после вакцинации в реакции нейтрализации на монослое первично-трипсинозированных клеток СП (таблицы 19, 20).

Таблица 19

Вируснейтрализующая активность сывороток крови бычков до и после вакцинации ГОА-сапонин вакциной из вируса ящура Армения/98

№ бычков	Титры ВНА, log ₂			
	Против 56 ТЦД ₅₀ вируса ящура Армения/98		Против 75 ТЦД ₅₀ вируса ящура А ₂₂ №550	
	до вакцинации	на 20-й день после вакцинации	до вакцинации	на 20-й день после вакцинации
1	0	1,25	0	1,75
2	0	0,75	0	Цельн.
3	0	0,75	0	0,25
4	0	2,25	0	1,50
5	0	0,75	0	Цельн.
6	0	2,75	0	1,00
Средние значения титров		1,42±0,357	-	0,75±0,382

Данные приведенные в таблице 19 показывают, что сыворотка крови животных второй группы до вакцинации не содержала антител против вируса ящура Армения/98 и А₂₂ №550. К 20-му дню после введения вакцины, содержащей 0,82 мкг 146+75 S компонентов вируса штамма Армения/98, появились вируснейтрализующие антитела (ВНА) в титре 1,42±0,357 log₂, т.е. 0,1-0,6 мл сыворотки нейтрализовали 56 ТЦД₅₀ гомологичного вируса. Титр ВНА против гетерологичного вируса был 0,75±0,382 log₂, т.е. 0,3-0,8 мл сыворотки нейтрализовали 75 ТЦД₅₀ вируса ящура А₂₂ №550.

Третью группу (бгол.) животных вакцинировали референс-вакциной в дозе 2мл, содержащей 10,0мкг 146+75 S компонентов вируса ящура А₂₂ №550.

Через 20 дней после вакцинации, третья группа бычков (таблица 20), имела титр ВНА в сыворотке крови 5,96±0,15 log₂ против гомологичного вируса, при отсутствии ВНА перед вакцинацией. Против вируса ящура Армения/98 средний титр ВНА составил 0,58±0,22 log₂.

**Вируснейтрализующая активность сывороток крови бычков до и после
вакцинации ГОА-сапонин вакциной из вируса ящура А₂₂ №550**

№ бычков	Титры ВНА, log ₂			
	Против 56 ТЦД ₅₀ вируса ящура Армения/98		Против 75 ТЦД ₅₀ вируса ящура А ₂₂ №550	
	до вакцинации	на 20 день после вакцинации	до вакцинации	на 20 день после вакцинации
1	0	1,00	0	5,75
2	0	0,75	0	6,00
3	0	0,25	0	6,50
4	0	0,5	0	5,50
5	0	1,00	0	5,75
6	0	Ц	0	6,25
Средние значения титров		0,58±0,22	-	5,96±0,15

Следовательно, для нейтрализации 75 ТЦД₅₀ гомологичного вируса было достаточно 0,01-0,02мл сыворотки А₂₂№550, тогда как для нейтрализации 56 ТЦД₅₀ гетерологичного вируса Армения/98 требовалось 0,42-1,2 мл сыворотки. Это указывает о значительных антигенных различиях между вирусом ящура А₂₂ №550 и Армения/98.

Вакцинированных бычков обеих групп через 24 дня после вакцинации заразили афтозным вирусом ящура штамма Армения/98 под слизистую языка в две точки в дозе 4,8 Ig ИД₅₀ в объеме 0,2 мл. Рабочую дозу вируса определяли титрованием на контрольных животных по методу Гендерсона. После вакцинации вели ежедневный клинический осмотр животных. Результаты контрольного заражения животных второй и третьей групп вирусом ящура Армения/98 показали (таблица 21) одинаковую напряженность иммунитета против вируса штамма Армения/98, так как в обеих группах было по одному бычку с генерализацией ящура и все животные имели первичные афты. Титры ВНА в сыворотке крови бычков, привитых вакциной из вируса А₂₂ №550, превосходили титры ВНА у бычков, привитых вакциной из вируса Армения/98. Однако, титры ВНА сывороток крови против вируса штамма Армения/98 отличались от титров против вируса А₂₂ №550 всего в 1,8 раз.

**Реакция вакцинированных животных на контрольное
заражение афтозным вирусом Армения/98 в дозе 4,8 lg ИД₅₀ мл**

№ животных	Животные, вакцинированные против вируса ящура Армения/98		№ животных	Животные, вакцинированные против вируса ящура А ₂₂ №550	
	первичные афты	генерализация		первичные афты	генерализация
1	+	+	1	+	-
2	+	-	2	+	-
3	+	-	3	+	+
4	+	-	4	+	-
5	+	-	5	+	-
6	+	-	6	+	-
Контрольные животные			1	+	+
			2	+	+

Примечание: + – наличие афт

- – отсутствие афт

Следовательно, можно предполагать, что профилактическая иммунизация крупного рогатого скота вакциной из штамма А₂₂ будет недостаточно эффективна в отношении вируса Армения/98, особенно в отдаленные сроки после прививки.

Таким образом, получен производственный штамм нового варианта ящура типа А – Армения/98. Экспериментальная противоящурная вакцина, приготовленная на основе вируса ящура штамм Армения/98 при испытании на крупном рогатом скоте показала достаточно высокую иммуногенность против гомологичного штаммавируса ящура, не уступающая вакцине из вируса А₂₂ №550.

*3.5.2. Эффективность противоящурной вакцины из штамма О №1920 “Армения” 2002
против эпизоотического штамма О №2041-2007, выделенного в Нагорно-Карабахской
Республике (НКР)*

В качестве вакцинных используются штаммы с широким антигенным спектром и наиболее близкие в антигенном отношении к циркулирующим штаммам. Путем многократных пассажей (20) на чувствительных культурах клеток в МСХ НЦЖВ получен

вакцинный штамм вируса ящура О №1920 “Армения” 2002. На основе этого штамма была разработана вакцина против ящура типа О. Во время эпизоотии в НКР в 2007 году был выделен новый изолят, получивший в дальнейшем название штамм вируса ящура типа О №2041 НКР 2007, который был аналогичен штамму О №1920 “Армения”2002

На основе инактивированного антигена КВЯ типа О№1920 “Армения”2002 были приготовлены сорбированная и эмульсионная вакцины. Приготовленные вакцины проверяли на авирулентность и безвредность.

Проверка на авирулентность и безвредность проведена на крупном рогатом скоте (5 голов бычков 18 мес. возраста массой 200-230кг) и свиньях (5 голов поросят 4-5 мес. возраста массой 40-50кг), доставленных из благополучного хозяйства Абовянского района Армении (2007г.).

Проверку авирулентности проводили путем введения средней пробы вакцины КРС в подслизистую языка методом тонелирования в 20 точек по 0,1 мл. Поросятам вакцину вводили в подслизистую языка (10 точек по 0,1 мл) и в область венчика правой задней конечности в дозе 2,0 мл. Наблюдение за привитыми животными проводили в течение 10 дней. Клинических признаков ящура не установлено.

Проверка безвредности проведена на тех же 5 головах КРС и свиней. Вакцина введена подкожно в область средней трети шеи в дозе 10мл, поросятам – внутримышечно в дозе 5,0 мл. У животных в течение 5 дней измеряли температуру тела и наблюдали за местной реакцией. Температура тела у животных через 12 часов повысилась до 40,0-40,2°С (КРС) и 40,5-40,6°С (свиньи) и удерживалась на этом уровне одни сутки. На месте введения у КРС отмечены незначительные инфильтраты, которые рассасывались на 3-4-й день. По результатам проверки вакцины оказались авирулентными, безвредными.

Сорбированной вакциной привили 10 голов КРС массой 300-400 кг (таблица 22), а эмульсионной – три подсвинка массой около 40 кг (таблица 23). Прививная доза сорбированной вакцины, равная 2,0 мл, содержала 8 мкг иммуногенных компонентов вируса ящура, 43% трехпроцентного ГОА и 1,5 мг сапонина. Активность вакцины определяли SES-методом, для чего вакцину развели в 7 раз безадьювантным буферным раствором и

полученным разведением привили подкожно 10 голов КРС. Каждое животное получило 1,14 мкг иммуногенных (146 S и 75 S) компонентов вируса в 2 мл.

Таблица 22

Испытание ГОА-сапонин вакцин из КВЯ типа О №1920 “Армения-2002” на КРС

№ живо тн.	Результаты контрольного заражения		Титр ВНА log ₂ в сыворотке крови против					
	наличие		Штамма О №1920			Штамма О №2041		
	Первичных афт	Генерализация	0ДПВ	10ДПВ	21ДПВ	0ДПВ	10ДПВ	21ДПВ
1	+	-	0	1,50	2,50	0	2,00	1,00
2	+	+	0	0,75	1,25	0	0,75	0,50
3	+	-	0	1,75	3,75	0	1,50	1,50
4	-	+	0	0,75	1,50	0	0,25	0,75
5	+	+	0	0,50	2,25	0	1,25	0,5
6	-	-	0	2,25	2,75	0	2,75	2,50
7	+	-	0	2,25	2,75	0	1,50	0,75
8	-	+	0	1,25	0,00	0	1,00	0,50
9	-	-	0	3,00	1,75	0	2,25	1,50
10	-	-	0	1,25	1,50	0	1,75	1,75
Среднее значение титров				1,52±0,2	2,00±0,33	-	1,5±0,50	1,12±0,21
				p<0,05	p<0,05		p<0,025	p<0,05

Примечание: контрольные животные (2 головы) заболели генерализованной формой ящура.

Эмульсионная вакцина в прививной дозе 2 мл содержала 3,4 мкг иммуногенных (146 S и 75 S) компонентов вируса и 1,2 мл масляного адьюванта ISO-70.

Иммунный статус животных оценивали, исследуя сыворотки крови, полученные в реакции нейтрализации на монослое первичнотрипсинизированных клеток почки свиньи. Контрольное заражение проводили на 21 ДПВ введением под слизистую языка суспензии афтозного вируса типа О №2041 “НКР” в дозе 10000 ИД₅₀ в объеме 0,2 мл. Через 7 дней наблюдения опыт завершили клиническим осмотром животных.

Сыворотку крови КРС исследовали против 2-х штаммов вируса ящура типов О №1920 “Армения” 2002 и О №2041 “НКР”.

Данные таблицы 22 показывают, что на 10 ДПВ в сыворотках крови КРС появились ВНА в разных титрах: $1,52 \pm 0,2 \log_2$ против вируса ящура штамма О №1920 и $1,50 \pm 0,50 \log_2$ против вируса типа О №2041.

На 21 ДПВ уровень ВНА к вирусу типа О №1920 составил $2,00 \pm 0,33 \log_2$ (увеличился в 1,3 раз). Разница в титрах ВНА на 21 ДПВ против гомологичного и гетерологичного штаммов возросла до 1,8 раза.

Прививная доза вакцины содержала 8,9 ПД₅₀ КРС, что свидетельствует о высокой активности вакцины против заражения вирусом ящура типа О №2041 “НКР”.

Таблица 23

Вируснейтрализующая активность сыворотки крови подсвинков до и после вакцинации эмульсионной вакциной из вируса ящура типа О №1920 “Армения-2002”

№ п/п	Титр ВНА \log_2 в сыворотке крови против КВЯ					
	О №1920			О №2041		
	0 ДПВ	10 ДПВ	17 ДПВ	0 ДПВ	10 ДПВ	17 ДПВ
1	0	4,25	6,25	0	3,50	6,75
2	0	4,50	5,75	0	2,75	6,50
3	0	3,00	5,75	0	3,50	7,00
Среднее значение		$3,92 \pm 0,46$	$5,92 \pm 0,17$	-	$3,25 \pm 0,25$	$6,75 \pm 0,14$
титров		$p < 0,025$	$p < 0,001$	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Данные приведенные в таблице 23 показывают одинаковый уровень антител к двум различным штаммам вируса ящура типа О.

3.5.3. Изучение иммуногенной активности эмульсионной и сорбированной противоящурной вакцин из штамма Азия-1 №1933/Армения/2000 на крупном рогатом скоте и свиньях

Целью данных исследований было изучение возможности защиты животных вакциной из штамма культурального вируса ящура Азия-1 №1933/Армения/2000 от прямого заражения гетерологичным штаммом вируса ящура Азия-1 №1737 Грузия/2000.

В работе использовали КВЯ типа Азия-1 №1933/Армения/2000, выращенный в суспензии клеток ВНК-21. Инактивацию инфекционности вируса проводили аминоэтил этиленимином в концентрации 0,05% в течение 12 часов при 37°C [123]. Количество иммуногенных компонентов определяли иммунохимическим методом.

Авирулентность инаktivированного аминоэтил этиленимином антигена контролировали на первично трипсинизированной культуре клеток СП, а готовой вакцины – на КРС. При этом, каждому из пяти неиммунных животных вводили по 2 мл вакцины в 20 точек слизистой оболочки языка по 0,1 мл.

Сорбированную вакцину контролировали на безвредность на 5 головах КРС, вводя вакцину подкожно по 10 мл каждому животному. При контроле на безвредность эмульсионной вакцины ее вводили свиньям (5 гол.), внутримышечно по 5 мл.

В опытах использовали КРС массой 300-400 кг. Активность вакцин проверяли, прививая животных цельной вакциной. Контрольное заражение 10 животных, иммунизированных сорбированной и эмульсионной вакцинами (по 5 голов каждой), и двух контрольных голов проводили на 19 и 20 день после вакцинации путем введения в слизистую языка суспензии афтозного вируса ящура КРС типа в дозе 10^4 ИД₅₀/0,2 мл.

Иммунизацию подсвинков массой 30-40 кг, полученных из благополучных по ящуру хозяйств, проводили путем внутримышечного введения вакцины в дозе 2 мл. Контрольное заражение 15 вакцинированных и двух контрольных животных осуществляли через 26 ДПВ путем интрадермоингвального введения вируса ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000, адаптированного к свиньям, в дозе 10^4 ИД₅₀/0,2 мл.

Иммуногенную активность вакцин из инаktivированного вируса ящура рассчитывали путем определения 50% иммунизирующей дозы. Уровень гуморального иммунитета оценивали по количеству ВНА в сыворотках крови, определенному в реакции нейтрализации. Через 7 дней наблюдения опыт завершили осмотром зараженных животных.

Для иммунизации КРС и подсвинков против ящура применяли моновалентную эмульсионную вакцину с содержанием иммуногенных компонентов – 4,72 мкг/мл и масляного адьюванта ISA-70. Соотношение водной фазы антигена и масляного адьюванта составляло 50:50.

Контрольное заражение пяти голов КРС, привитых моновалентной вакциной из КВЯ Азия-1 №1933/Армения/2000, и двух контрольных бычков проводили на 20ДПВ вирусом ящура штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000. Сыворотки крови животных, полученные на 7 и 20 ДПВ, исследовали на наличие ВНА против вируса ящура штаммов Азия-1 №1933/Армения/2000 и Азия-1 №1737/Грузия/2000.

Данные, представленные в таблице 24, показывают, что вакцина из КВЯ Азия-1 №1933/Армения/2000 на 20 ДПВ индуцировала в организме КРС количество ВНА, равное $6,60 \pm 0,47 \log_2$ против вируса ящура Азия-1 №1933/Армения/2000. С 7 по 20 ДПВ титр ВНА против вируса этого штамма возрос в 1,7 раз.

Титр ВНА \log_2 на 20 ДПВ против гетерологического штамма вируса ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000 составил $3,80 \pm 0,53 \log_2$. С 7 по 20 ДПВ титр ВНА против вируса ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000 увеличился в 1,4 раз. От контрольного заражения гетерологичным афтозным вирусом ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000 было защищено одно животное из 5 вакцинированных. Животное не заболело генерализованной формой ящура и не имело первичных афт.

Таблица 24

**Испытание эмульсионной вакцины изготовленной из вируса ящура
Азия-1 №1933/Армения/2000 на КРС (n=5)**

Валентность опытной вакцины	Кол-во иммуногенных компонентов в дозе 2 мл (мкг)	Кол-во защищенных животных от контрольного заражения	Титр ВНА \log_2 в сыворотке крови против КВЯ штамм			
			Азия-1 №1933/Армения/2000		Азия-1 №1737/Грузия/2000	
			7ДПВ	20ДПВ	7ДПВ	20ДПВ
Азия-1	9,44	1	$3,85 \pm 0,45$ $p < 0,005$	$6,60 \pm 0,47$ $p < 0,001$	$2,60 \pm 0,20$ $p < 0,001$	$3,80 \pm 0,53$ $p < 0,005$
Контроль вируса	Контрольные животные заболели генерализованной формой ящура					

Количество ВНА против вируса ящура штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000 на 20 ДПВ было в 1,7 раз меньшим, чем против вируса гомологичного штамма Азия-1 №1933/Армения/2000.

В таблице 25 представлены результаты иммунизации 15 голов подсвинков вакциной из КВЯ Азия-1/Армения/1933 в цельном виде и в разведениях. Контрольное заражение осуществляли вирусом ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000. На 26 ДПВ титр ВНА в сыворотке крови животных, привитых цельной вакциной против гомологичного штамма вируса ящура Азия-1 №1933/Армения/2000, был равен $6,30 \pm 0,34 \log_2$, против гетерологичного штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000 – $6,0 \pm 0,58 \log_2$. При контрольном заражении заболело одно животное, привитое вакциной в разведении 1:5, все остальные животные были защищены. Вакцина в разведении 1:25 с содержанием иммуногенных компонентов 0,38 мкг в дозе, при уровне ВНА, равном $3,62 \pm 0,46 \log_2$, защищала животных от контрольного заражения афтозным вирусом ящура Азия-1 №1737/Грузия/2000.

Таблица 25

**Иммуногенная активность эмульсионной вакцины из вируса ящура
Азия-1 №1933/Армения/2000 на свиньях (n=5)**

Разведение вакцины	Кол-во иммуногенных компонентов в дозе 2 мл (мкг)	Кол-во защищенных животных от контрольного заражения	Титр ВНА \log_2 в сыворотке крови животных на 26 ДПВ против КВЯ	
			Азия-1 №1933/ Армения/ 2000	Азия-1 №1737/Грузия/ 2000
1:25	0,38	5	$3,62 \pm 0,46$ $p < 0,001$	Не исслед.
1:5	1,9	4	$5,70 \pm 0,48$ $p < 0,001$	$4,9 \pm 0,32$ $p < 0,001$
Цельн.	9,44	5	$6,30 \pm 0,34$ $p < 0,001$	$6,0 \pm 0,58$ $p < 0,001$
Контроль вируса	контрольные животные заболели генерализованной формой ящура			

Сравнивая количество ВНА, индуцированное вакциной в цельном виде и в разведении 1:5 против гомологичного ($6,30 \pm 0,34$ и $5,70 \pm 0,48 \log_2$) и гетерологичного ($6,0 \pm 0,58$ и $4,9 \pm 0,32 \log_2$) штаммов, можно сделать заключение о незначительных отличиях этих штаммов. Титры ВНА против вируса ящура штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000 в 0,95 раз меньше, чем против вируса ящура Азия-1/Армения/1933-2000. Испытанная вакцина показала высокую

активность и содержала в прививном объеме 40ПД₅₀. В таблице 26 представлены результаты испытания сорбированной вакцины из КВЯ Азия-1 №1933/Армения/2000 на КРС против гомологичного и гетерологичного штамма вируса ящура типа Азия-1. Крупный рогатый скот иммунизировали сорбированной вакциной в разведении 1:20 1% гелем ГОА. Контрольное заражение проводили на 19 день после вакцинации афтозным вирусом ящура Азия-1 №1933/Армения/2000. Сыворотки крови, полученные на 19 день после вакцинации, исследовали в реакции нейтрализации против гетерологичного штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000.

Таблица 26

Изучение гуморального иммунитета у КРС, привитого сорбированной вакциной из культурального вируса ящура Азия-1 №1933/Армения/2000 (n=5).

Кол-во иммуногенных компонентов в дозе 2 мл, мкг	Результаты контрольного заражения		Титр ВНА log ₂ в сыворотке крови животных на 19 ДПВ	
	Наличие первичных афт	Наличие генерализации	Азия-1 №1933/Армения/2000	Азия-1 №1737Грузия/2000
1,3	5	1	3,10±0,17 p<0,001	2,3±0,24 p<0,001
Контроль вируса	Контрольные животные заболели ящуром с генерализацией процесса			

Титр ВНА, индуцированный вакциной против гомологичного штамма, составил 3,10±0,17 log₂ на 19 ДПВ, против гетерологичного штамма Азия-1 №1737/Грузия/2000 – 2,3±0,24 log₂ соответственно. Несмотря на низкий титр ВНА против вируса гомологичного штамма, вакцина в разведении 1:20 защитила от генерализации процесса при контрольном заражении гомологичным штаммом вируса ящура 4 животных из 5 вакцинированных.

3.6. Стратегия и тактика по профилактике и борьбе с ящуром в Армении на современном этапе

Несмотря на значительные успехи в решении многих аспектов борьбы с ящуром, эта болезнь продолжает оставаться одной из наиболее часто регистрируемых вирусных болезней животных.

Способность к широкому распространению, высокая контагиозность и ряд других

особенностей данной инфекции создают огромные трудности в ликвидации болезни, требуя постоянного совершенствования программ борьбы. Анализ официальных данных МЭБ свидетельствует о напряженной ситуации в мире по этой инфекции.

Напряженная ситуация сохраняется также в Республике Армения, географическое расположение которого (общность границ со стационарно неблагополучными по ящуру Турцией и Ираном) относят республику к зоне высокого риска возникновения ящура. За последние десятилетия на территории Армении неоднократно регистрировали вспышки ящура, вызванные заносом возбудителя из сопредельных государств. Однако, в связи с обострением ситуации в Турции, неблагополучием в Иране и других странах, эпизоотические прогнозы на последние годы остаются весьма неблагоприятными.

Сложившаяся ситуация еще раз подчеркнула необходимость в реализации программы совместной борьбы с ящуром, направленной на обеспечение благополучия по ящуру каждого государства, минимизацию экономического ущерба при возможном возникновении вспышек ящура, координацию и оптимизацию совместных действий ветеринарных служб государств-участников СНГ. При разработке программы учитывались новые концепции профилактики и борьбы с ящуром.

В Республике Армения в соответствии с программой по заданию Правительства был разработан план соответствующих мероприятий, согласно которому ветеринарными службами ежегодно в плановом порядке осуществляются систематические противоящурные мероприятия, финансирование которых обеспечиваются государственным бюджетом РА.

Наряду с Законом “О ветеринарии”, целевой программой “Мероприятия по недопущению и ликвидации карантинных и особо опасных заразных болезней животных в Республике Армения” был принят нормативный правовой акт, регламентирующий порядок идентификации сельскохозяйственных животных. Реализация данного мероприятия позволит упорядочить учет скота, создать компьютерный банк данных по учету поголовья животных, составлять план ветеринарно-профилактических мероприятий фактически имеющегося поголовья скота, что способствует объективному определению потребности средств на эти цели, усилению контроля за их проведением и более успешному выполнению заданий Программы.

Учитывая возникавшие вспышки ящура до 2007 года в разных областях республики, на ее территории проводится ежегодная двукратная иммунизация всего поголовья КРС и МРС только в зоне риска. В связи с напряженной обстановкой по ящуру в сопредельных государствах в целях координации наблюдения и контроля за ящуром и усиления способности управления чрезвычайными ситуациями в республике со стороны международных организаций ФАО/МЭБ/ЕК действует проект, направленный на усовершенствование системы эпидемиологического надзора за трансграничными инфекциями, поддержание буферной зоны с приграничными неблагополучными по ящуру странами.

В соответствии с Проектом на территории республики действует противоящурная буферная зона, которая охватывает 12 приграничных районов с Турцией и Ираном. Ежегодно со стороны указанных организаций республике выделялись финансовые ресурсы на приобретение определенного количества противоящурной вакцины, контроль за иммунным фоном поголовья, осуществление серомониторинга, обучение местных ветеринарных специалистов.

Вакцинация КРС в районах буферной зоны против ящура осуществляется вакциной производства ФГУ “ВНИИЗЖ”.

В целях контроля вакцинации животных против ящура и оценки иммунного фона в РА проводится систематическая работа по серологическому мониторингу путем осуществления отбора и исследований два раза в год сывороток крови вакцинированных животных.

В соответствии с программой “Мероприятия по недопущению и ликвидации карантинных и особо опасных заразных болезней животных в Республике Армения” при подозрении заболевания животного ящуром об этом немедленно информируется Государственная ветеринарная инспекция Министерства сельского хозяйства, отбираются и направляются патматериалы в НЦОАРБПП РА, в Региональную референтную лабораторию МЭБ по ящуру ФГУ “ВНИИЗЖ”, г.Владимир. В случае подтверждения заболевания предусмотрено информирование МЭБ (г.Париж) и ветеринарных служб государств-участников СНГ.

На основе указанной Программы в РА разработаны национальные программы, Правила

(инструкции) по профилактике и борьбе с ящуром.

В нем предусмотрены следующие мероприятия:

1. Разработка Правил профилактики и борьбы с ящуром животных в Республике Армения.
2. Создание информационной системы и баз данных по слежению за глобальной эпизоотической ситуацией по ящуру и другим особо опасным болезням животных с использованием ГИС (геоинформационных технологий)
3. Осуществление мониторинга (эпизоотологического и иммунологического) в различных зонах страны с целью контроля иммунного фона, выявления возможного вирусоносительства, в том числе у диких животных.
4. Организация проведения профилактической иммунизации животных в зонах высокой степени риска заноса и распространения ящура (ежегодная вакцинация КРС и МРС).
5. Создание и поддержание резервов противоящурных вакцин, диагностикумов, дезосредств, химфармпрепаратов, автотранспорта и других материально-технических ресурсов для локализации и ликвидации возможных ящурных очагов.
6. Организация учебы, стажировок и семинаров для ветеринарных специалистов Армении с целью повышения их квалификации по вопросам диагностики, профилактики и борьбы с ящуром животных.

Исходя из вышеизложенного программой предлагается альтернативная стратегия борьбы на современном этапе, а именно:

- а) усовершенствование системы эколого-диагностического мониторинга и информационной сети ветеринарного надзора;
- б) усовершенствование традиционных и создание новых средств и методов диагностики;
- в) проведение непрерывного эпизоотологического надзора за возможным появлением и распространением ящура в стране, анализ этих случаев, разработка прогнозов возможного появления и распространения инфекции;
- г) индикация и дифференциация возбудителя вируса ящура, в т.ч. с использованием молекулярно-биологических методов исследования;

- д) производство усовершенствованных и новых вакцинных и диагностических препаратов;
- е) организация современной базы производства и контроля качества биопрепаратов;
- ж) организация и проведение систематического экологического, диагностического и иммунологического мониторинга;
- з) совершенствование системы подготовки и переподготовки кадров лабораторно-диагностической сети ветеринарной службы.

Так, в период с 1999 по 2012 гг. со стороны НЦОАРБПП при активном участии ветеринарных служб Армении, при финансовой поддержке ФАО/МЭБ/ЕК было обеспечено функционирование противоящурной буферной зоны в Армении. Были проведены ежегодные поставки по 250 000 доз бивалентной “А, О” и трехвалентной “А, О, Азия-1” вакцин, контроль за иммунным фоном, осуществление серомониторинга, обучение местных ветеринарных специалистов. Все это в определенной мере позволило обеспечить благополучие данного региона по ящуру.

Таким образом, можно отметить, что намеченные мероприятия Программы совместных действий в государствах-участниках СНГ и в Республике Армении в основном реализованы.

В республике проводятся соответствующие противозпизоотические мероприятия. Осуществляется взаимодействие с международными организациями (МЭБ/ФАО/ЕС) по гармонизации действий ветеринарных служб государств по обеспечению функционирования противоящурной буферной зоны страны.

Разработана и утверждена решением Совета глав правительств СНГ Программа совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах для выполнения на период до 2020 года.

Объединение и координация совместных действий государств-участников СНГ способствует предупреждению заноса и распространения ящура на территории Армении, минимализации экономического ущерба при возможном возникновении вспышек ящура, обеспечивает повышение продуктивности животноводства и рентабельности отрасли.

ГЛАВА IV. АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ

4.1. Занос и анализ причин заноса и распространения

экзотического вируса АЧС

После подтверждения АЧС на территории Грузии в 2007 году, нами был проведен сбор информации на предмет особенностей содержания и кормления свиней в хозяйствах, расположенных на территории приграничных с Арменией районов Грузии. Характеристика развития эпизоотического процесса АЧС на территории Грузии и оценка угрозы ее трансграничного распространения были выполнены посредством анализа эпизоотических данных за апрель-июнь 2007 года. На основании полученных результатов нами был проведен анализ риска заноса АЧС на территорию Армении и оценка подверженности приграничных с Грузией районов эпизоотическому риску [325, 340].

С целью раннего выявления АЧС на территории Армении, в период с 1-го июля по 30-е сентября 2007 года было проведено активное отслеживание развития эпизоотической ситуации на территории приграничных с Грузией областей Армении. Сбор анамнестических и эпизоотических данных был выполнен посредством опроса владельцев свиней, практикующих ветеринаров и специалистов Государственной службы безопасности пищевых продуктов МСХ Армении. Выявление заболевания проводилось на основании результатов клинического осмотра подозреваемых в заболевании и вскрытия павших животных. Предварительная диагностика АЧС была выполнена в лаборатории научного центра животноводства и ветеринарии. С сентября до конца 2007 года активное отслеживание АЧС проводилось во всех областях Армении. На основании полученных данных были выполнены воспроизведение сценария заноса заболевания, картография его первичных и вторичных очагов заболевания, ретроспективный анализ причин их возникновения и характеристика эпизоотического процесса в 2007 году.

С января 2008 по июнь 2011 года включительно синдромный надзор над развитием эпизоотической ситуации по АЧС проводился в соответствии с оповещениями о заболевании или падеже свиней, поступающими в ГСБПП МСХ РА [393, 394, 395, 396, 397]. В хозяйствах, где регистрировались инциденты производился сбор данных (анамнестических и

эпизоотических) и забор проб патологического материала у больных, подозреваемых в заболевании или павших животных. Тестирование образцов патологического материала было выполнено в лаборатории НЦЖВ. На основании полученных данных была выяснена характеристика причинно-следственных связей, лежащих в основе генерализации эпизоотического процесса. Посредством ретроспективного и оперативного анализа были определены фазы эволюции заболевания, характер его текущего проявления и тенденции дальнейшего развития. В качестве дополнительного материала использовались данные ГСБПП МСХ РА, Центра по оказанию услуг в области ветеринарной санитарии, безопасности пищевых продуктов и фитосанитарии, департамента животноводства и зоотехнии МСХ РА и Национальной статистической службы Армении.

С целью выявления степени вовлечённости диких кабанов и клещей в эпизоотический процесс АЧС на территории лесогорной зоны был организован отстрел диких кабанов и сбор проб энтомологического материала в пораженных хозяйствах. Тестирование образцов было выполнено в лаборатории НЦЖВ. Посредством сравнительного анализа была определена фактическая степень вовлечения диких кабанов и клещей (*Argasidae* и *Ixodidae*) в эпизоотический процесс АЧС на территории Армении. Работа была выполнена в рамках национального проекта Сельскохозяйственной и Продовольственной Организации ФАО TCP/ARM/3102 при техническом содействии регионального проекта ЕК № 4/2008/156035/1. В качестве дополнительного материала использовались данные министерства охраны природы Республики Армения, научного центра зоологии и гидроэкологии (НЦЗГЭ) и армянского представительства Всемирного фонда дикой природы (ВФДП).

Среди ветеринарных специалистов существуют различные мнения относительно причин распространения АЧС на территорию Армении из Грузии, однако их определение требует правильного понимания различных факторов, лежащих в основе развития эпизоотического процесса. В данном контексте в первую очередь необходимо рассмотреть факторы, сопряженные с заносом заболевания. ПКИ инфекции па территории Грузии и ПОР для поголовья домашних свиней зоны ВЭР на территории Армении свидетельствуют, что заражение отдельных особей в НКР могло иметь место уже в конце мая или первой половине июня 2007 года. Данный отрезок времени коррелирует с пиком интенсивности эпизоотии

АЧС в Грузии, когда произошел массивный выброс ее вируса в окружающую среду. При сопоставлении продолжительности инкубационного периода заболевания с интервалом между его первым клиническим случаем и последующими вспышками, можно заключить, что инфицирование в зоне ВЭР имело место во второй половине июня. Не исключается, что уже к концу месяца падеж свиней от АЧС имел место в отдельных ППХ Ноемберянского района, однако инфекция была диагностирована как КЧС, пастереллез или отравление.

Тип содержания позволяет заключить, что занос вируса АЧС в поголовье домашних свиней Ноемберянского района мог произойти как естественным (в результате их прямого или непрямого контакта с инфицированными животными из Грузии), так и механическим (посредством биотических, абиотических и антропогенных элементов) путями. В качестве биотических элементов, нами рассматривались бродячие и дикие животные (в т.ч. дикие кабаны), а также хищные птицы (вороны, сороки, грачи), большое скопление которых отмечалось в окрестностях Барекамавана и Коти за несколько дней до падежа свиней. Из абиотических факторов рассматривалась вероятность заноса вируса ветром. Одним из примеров является эпизоотия ящура в 1967 году, когда его возбудитель был занесен ветром из континентальной Европы на территорию Англии. Похожая ситуация, приуроченная к пылевым бурям, была зафиксирована и ветеринарными специалистами из Южной Кореи в 2000 году. Из числа антропогенных факторов следует особо отметить низкий уровень организации ветеринарно-санитарного контроля и дезинфекции на КПП въезда на территорию Армении, а также бесконтрольную розничную торговлю сырьем и продуктами животного происхождения, зафиксированную нами на сельских рынках по обе стороны армяно-грузинской границы в период с мая по июнь 2007 года.

По нашему мнению, одной из основных причин межрайонного распространения АЧС на территории Армении являлась низкая интенсивность противоэпизоотических мероприятий в ее первичных очагах. Так, например, в Бердаване насчитывалось около 1.4 тыс. домашних свиней, однако после получения результатов предварительного диагноза, было уничтожено всего 4 гол. При повторных вспышках заболевания уничтожались только больные или подозреваемые в инфицировании животные (169 голов), а основное поголовье (1216 голов) было уничтожено только к концу месяца. Концентрация такого количества

восприимчивых животных со сходными показателями резистентности явилась идеальной средой для кумуляции возбудителя инфекции и его выброса во внешнюю среду. Следующей причиной мы считаем отсутствие надлежащего оповещения населения о заносе АЧС и ее опасности. Нежелание сотрудников ГСБПП предоставлять информацию относительно причин массового уничтожения свиней в Бердаване вызвало панику среди населения близлежащих общин, в результате которой начался беспорядочный убой свиней, который, как предполагается, сопровождался масштабной контаминацией внешней среды вирусом.

При сопоставлении продолжительности инкубационного периода при АЧС с продолжительностью интервала между ее вспышками, можно заключить, что межрайонное распространение заболевания на территории Тавуша имело место во второй половине июля 2007 года. Уже в конце вспышки инфекции были зарегистрированы среди домашних свиней в ППХ двух районов области. Вынос АЧС за пределы Тавуша был обусловлен как многочисленными нарушениями карантинно-ограничительных требований со стороны населения, так и неудовлетворительным уровнем организации ветеринарного надзора в Ноемберянском и Иджеванском районах. Убой больных (и подозреваемых в заболевании) свиней и продажа их мяса перекупщикам происходило преимущественно ночью, что существенно осложняло работу ГСБПП. После пресечения первых попыток контрабандного вывоза свинины по центральным магистралям, перекупщики начали ее вывоз объездными сельскими дорогами, где из-за недостатка персонала и технических средств (транспорт, инвентарь, дезинфектанты и т.д.), карантинные посты ГСБПП не были установлены. Таким образом, уже во второй половине июля на территории северо-восточной части Армении сложились условия как для формирования ИПС АЧС, так и для расширения ареала ее активности.

Ситуация существенно осложнилась в августе, когда граждане Армении начали возвращаться с курортов, расположенных в неблагополучных по заболеванию регионах Грузии (Самегрело, Земо Сванетия и Гурия). К этому времени в неблагополучных по АЧС общинах Тавуша оставалось больше 12 тыс. свиней. Уровень миграционной активности и масштабы транзитного товарооборота через территорию Грузии (морские порты Поти и Батуми) существенно повышали риск не только механического рассеивания вируса, но и

повторных его заносов посредством различных контаминированных объектов (транспорта, пищевых продуктов, бытовых предметов, и т.д.). В пользу данного предположения свидетельствует и то, что в августе большинство вспышек АЧС регистрировалось и в общинах, расположенных вдоль главных автомобильных магистралей, ведущих из Грузии в Армению. Анализ эпизоотических данных показал, что в течение указанного отрезка времени развитие эпизоотического процесса характеризовалось резким повышением показателей интенсивности. Так, если в июле 2007 года ПКИ заболевания на территории двух районов одной области Армении составлял 0,9 % при ПАТ 9 %, то уже к концу августа указанные показатели в 5-и районах двух областей страны составили 2 и 10 %, соответственно. О вспышках АЧС на территории Армении ГСБПП оповестила МЭБ только после того как массовый падеж домашних свиней был зарегистрирован в более чем 30-и сельских и городских общинах Тавуша и Лори. В сентябре заболевание распространилось на территории предгорной и равнинной зон страны. К концу месяца ПКИ инфекции достиг 3,2 %. Параллельно с ростом интенсивности эпизоотического процесса и расширением ареала его территориальной аппликации, среди неблагополучных по АЧС пунктов наблюдался рост удельного веса специализированных свиноводческих хозяйств. Несмотря на то, что в четвертом квартале ПКИ заболевания снизился до 0,1%, его нозоареал продолжал расширяться в юго-западном направлении республики. После заноса инфекции в Араратскую долину был зафиксирован незначительный рост ее инцидентности (0,3%), однако повышения напряженности эпизоотического процесса до конца года не наблюдалось [325, 329, 340].

Согласно данным МЭБ, в течение 2007 года от ГСБПП поступила информация о 14-и вспышках АЧС на территории двух областей Армении. В связи с этим необходимо отметить, что к середине сентября миссией ЕС/ФАО/МЭБ было зафиксировано уже 17 вспышек заболевания, а через неделю это количество возросло до 24-х [297]. К концу 2007 года на территории Армении было насчитано около 45 очагов инфекции, а ее вспышки были зарегистрированы на территории 8-и областей (Тавуша, Лори, Гегаркуника, Арагацотна, Котайка, Арарата, Армавира и Еревана). Согласно тем же данным, многочисленные вспышки заболевания были зарегистрированы и в Арцахе, где до конца года пало (и было вынужденно уничтожено) около 9 тыс. домашних свиней. Отсутствие комментариев о реальном развитии

эпизоотической ситуации по АЧС сотрудники ГСБПП объясняли угрозой экономических потерь из-за введения торговыми партнерами ограничительных санкций на экспорт продуктов животного происхождения [135].

В 2007 году АЧС была зарегистрирована в 9-и областях Армении, в 8-и из которых ее проявление характеризовалось массовостью поражения поголовья домашних свиней (ПКИ 3,6%). Характер развития эпизоотического процесса был предопределен как высокой вирулентностью возбудителя, так и многофакторностью механизмов его передачи в популяциях и субпопуляциях восприимчивых животных. По состоянию на декабрь 2007 года на борьбу с заболеванием было затрачено 36млн. армянских драмов (около 117 тыс. долларов), однако локализовать его все еще не удавалось. При изучении актов о выполнении противоэпизоотических мероприятий, выяснилось, что почти все выделенные средства были израсходованы на организацию захоронения павших (и вынужденно уничтоженных) свиней и первичную дезинфекцию помещений. В условиях масштабного распространения инфекции такие меры не могли задеть основных механизмов передачи ее агента, благодаря которым очаги продолжали “пульсировать” в отдельных районах, обеспечивая напряженность эпизоотической ситуации.

4.2. Выделение эпизоотического вируса АЧС на территории Армении и НКР в 2007-2011гг. и его идентификация

Современная концепция контроля ТБЖ основана на совершенствовании механизмов их раннего выявления, которые помогают ветеринарным специалистам выйти на принципиально новый уровень компетентности при принятии оперативных решений по организации противоэпизоотических мероприятий [349]. В связи с этим Региональная Комиссия МЭБ по Европе рекомендует внедрение унифицированной системы эпизоотологического надзора, обеспечивающей поступление информации об инцидентах (заболевание, падеж) среди поголовья как сельскохозяйственных, так и диких животных [316]. Эффективность указанной системы обусловлена функционированием специфических механизмов отслеживания и раннего выявления, которые являются не только ключевыми компонентами предупреждения заноса и распространения ТБЖ, но и рассматриваются в

качестве показателей уровня организации ветеринарного здравоохранения в целом [348]. После подтверждения АЧС на территории Грузии, Региональная Комиссия МЭБ по Европе рекомендовала ветеринарным службам усилить работу механизмов отслеживания и раннего выявления ТБЖ. Данная рекомендация в первую очередь относилась к ветеринарным службам государств, которые находились в зоне высокого эпизоотического риска АЧС.

Раннее выявление ТБЖ подразумевает в первую очередь наличие эффективной системы лабораторной диагностики. Необходимо также отметить, что по состоянию на 2007 года бюджет ветеринарных служб Армении не позволял проводить отслеживание и выявление болезней животных в соответствии с требованиями МЭБ, а выбор метода для их лабораторной диагностики в подавляющем большинстве случаев был обусловлен его стоимостью и доступностью реагентов для его проведения. К моменту поступления первого оповещения о падеже домашних свиней в Ноемберянском районе, РЦВД не располагал соответствующими реагентами (праймеры для ПЦР, тест-системы для ИФА, ФИТЦ для РПИФ) для диагностики АЧС. В сложившихся обстоятельствах предварительная диагностика заболевания имела ключевое значение для принятия оперативных решений по организации противоэпизоотических мероприятий в Ноемберянском районе. Из доступных на тот момент методов, рекомендуемых для лабораторной диагностики АЧС, мы выбрали РГАД. Выбор был обусловлен высокой чувствительностью и специфичностью данной реакции, которая, несмотря на продолжительность своей постановки, рекомендовалась МЭБ в качестве одного из основных справочных методов лабораторной диагностики АЧС [322].

При лабораторном исследовании патологического материала, отобранного из трупов двух павших в Бердаване свиней, адсорбция эритроцитов на поверхности отдельных клеток первичных культур лейкоцитов и макрофагов костного мозга свиней-доноров наблюдалась уже через несколько часов после ее инокуляции суспензиями органов подозреваемых в заболевании свиней. Болезнь была вызвана гемадсорбирующим штаммом вируса, что давало нам возможность читать реакцию еще до появления отчетливых цитопатических изменений в клетках. В нашей ситуации преимущество РГАД заключалось также в том, что она позволяла не только диагностировать АЧС, но и дифференцировать ее от КЧС, которая считалась одной из эндемичных болезней свиней на территории Армении. Дифференциация была основана на

визуальном различии цитопатогенной картины при микроскопическом исследовании, так как в отличие от вируса АЧС, возбудитель КЧС в культурах клеток лейкоцитов свиней (ККЛ) и костного мозга свиней (ККМ) цитолитических или гемадсорбирующих свойств не проявляет. В течение второй половины июля 2007 года при помощи РГАД нами было исследовано 35 образцов патологического материала, отобранного у павших, больных и подозреваемых в заболевании домашних свиней в различных общинах Тавуша, Лори и Ноемберянского района. При исследовании трупов павших свиней во всех случаях была отмечена разлитая гиперемия кожи подгрудка, брюха и внутренней поверхности бедер, а также цианоз кожи края ушных раковин и наружных слизистых оболочек (анального отверстия и влагалища). При вскрытии трупов, в 7-и случаях было отмечено скопление оранжево-красного экссудата в плевральной и перитонеальной полостях, кровенаполнение паренхиматозных органов и многочисленные точечно-полосчатые геморрагии на слизистой оболочке кишечника (тонкий и толстый отделы) (Приложение, Фото 1-6). Наиболее характерные поражения при АЧС были отмечены в лимфоидных органах (селезенка и прилежащие к ней лимфатические узлы), которые имели вишнево-черный цвет и находились в состоянии геморрагического воспаления. В двух случаях, помимо описанных поражений были отмечены кровоизлияния в почках и сердечных мышцах, а также очаги ателектаза, чередующиеся с участками эмфиземы в легких. Несмотря на указанные различия, при тестировании патологического материала при помощи РГАД, вирус АЧС был обнаружен в пробах как павших, так и больных животных.

В течение августа 2007 года мы продолжали отслеживание и предварительную диагностику АЧС на основании результатов клинического осмотра (26гол.), патологоанатомического вскрытия и РГАД. При клиническом осмотре, характерный при АЧС симптомокомплекс на различных стадиях развития был отмечен в 12-и из 26-и случаев. Поражения кожных покровов были выражены у 12-и свиней (геморрагический диатез кожи боковой поверхности брюха и внутренней поверхности бедер) (Приложение, Фото 7). В 11-и случаях был отмечен выраженный цианоз кожи края ушных раковин (у животных со светлой окраской), а в 4-х – экзантема кожи стопы между копытцевой каймой и пальцами. На фоне указанных признаков, у двух животных наблюдался паралич задних конечностей, а у 5-и –

хромота. В 9-и из 12-и случаев был отмечен гнойный конъюнктивит, в 6-и случаях – истечение гнойного секрета из носовых отверстий, и в 2-ух выделение катарального экссудата с примесью крови из уголков глаз. У всех больных свиней были зафиксированы гипертермия (41-42°C), аритмия (110-130 ударов в минуту), тахипноэ (30-40 движений в минуту) и сухой кашель. При обследовании 14-и подозреваемых в заболевании животных, в 8-и случаях было отмечено повышение температуры (39-40°C), сопровождающееся общим угнетением и вялостью. У двух свиней гипертермия сопровождалась возбужденным передвижением, которое перемежалось с застыванием в напряженном состоянии и резкой реакцией на звуки.

Параллельно с отслеживанием, в течение указанного периода нами были изучены и некоторые биологические свойства вируса АЧС, в частности репродуктивная активность в первичных ККЛ и ККМС свиней-доноров. При изучении биологических свойств возбудителя, мы использовали его эпизоотический штамм, выделенный из патологического материала, отобранного у свиней с клиническими признаками болезни в Тавуше и Лори. Путем последовательных пассажей вируса на первичных культурах ККЛ и ККМ были выделены и изучены штаммы “Тавуш 2007” и “Лори 2007”, которые были депонированы в банке патогенных микроорганизмов НЦЖВ.

Несмотря на результаты эпизоотологических исследований и предварительной диагностики, МЭБ было оповещено о неблагополучии Армении по АЧС только в конце августа 2007 года. Согласно ГСБПП, промедление было обусловлено техническими трудностями, с которыми столкнулись армянские ветеринарные службы при выполнении процедур, установленных МЭБ для пересылки проб патологического материала в справочную лабораторию для подтверждения предварительного диагноза. После того, как в решении проблемы не помогло посредничество ФАО, ГСБПП обратилась за содействием в Федеральную службу по ветеринарному и фитосанитарному надзору РФ. При посредничестве экспертов ФСВФП, уже во второй половине августа некоторые из образцов проб патологического материала, протестированных в лаборатории НЦЖВ, были оперативно доставлены в ВНИИВВиМ г. Покров. К концу августа предварительный диагноз, поставленный в НЦЖВ был подтвержден в лаборатории ВНИИВВиМ посредством РПИФ,

ПЦР и РГАД [285]. И только после получения подтверждения предварительного диагноза, ГСБПП официально оповестила МЭБ о неблагополучии двух областей страны по АЧС.

В сентябре объединенная миссия ЕС/ФАО/МЭБ провела предварительную оценку эпизоотической ситуации по АЧС на территории Армении и представила ГСБПП пакет рекомендаций по исполнению экстренных мер для предотвращения ее дальнейшего распространения. Поскольку на тот момент осуществление большинства рекомендованных мероприятий оказалось практически невозможным из-за различных ограничений (технических, финансовых и т. д.), то ГСБПП начала выполнение рекомендаций, которые не требовали больших финансовых затрат, а именно с транспортировки проб патологического материала в справочную лабораторию. Выяснилось, что техническая оснащенность армянского международного аэропорта “Звартноц”, также как и профессиональная подготовка его персонала не соответствовали минимальным требованиям, выполнение которых обязательно для всех авиакомпаний при транспортировке патогенных микроорганизмов группы А (Директива Организации Объединенных Наций №2900). Учитывая данное требование, а также свод правил безопасности при перевозке опасных грузов, утвержденный Международной Организацией Гражданской Авиации и Международной Ассоциацией Авиатранспорта, аккредитованные в Армении авиакомпании отказывались от технического содействия в транспортировке патологического материала в какую-либо страну.

До конца 2007 года мы продолжали отслеживать развитие эпизоотической ситуации по АЧС в соответствии с поступающими оповещениями о заболевании свиней. Оповещения поступали, в основном, от сельских ветеринаров, которые были предварительно ознакомлены с клиническими признаками (тахипноэ, кашель, геморрагический диатез кожных покровов, цианоз, конъюнктивит, парез или паралич конечностей), при появлении которых они должны были незамедлительно информировать ГСБПП. В течение месяца было обследовано поголовье свиней в 15-и ППХ 5-и областей Армении (Ереван, Котайк, Тавуш, Лори и Гегаркуник), однако заболевание было диагностировано только в 60% случаев, что составляло 40% от количества проб патологического материала (23 пробы), подвергнутых лабораторному исследованию. Во второй половине октября образцы проб были направлены

также в ВНИИВВиМ и при посредничестве ФАО в институт Фридриха Леффлера FLI (Реймс, Германия) для постановки окончательного диагноза (Приложение, Результаты FLI).

Институт FLI подтвердил диагноз на основании ПЦР. Результаты лабораторных исследований в НЦЖВ и ВНИИВВиМ приведены в таблице 27.

Имеющиеся у нас данные позволяют заключить, что вспышки АЧС на территории Закавказья были вызваны вирулентным штаммом ее вируса II-го генотипа. При помощи типизации агента с использованием штамм-специфичных ПЦР-праймеров в лаборатории ГНУ «ВНИИВВиМ» было установлено, что вспышки болезни в Абхазии и Армении были вызваны штаммом, аналогичным выделенному на территории Грузии [135]. Позднее, различными научно-исследовательскими центрами было подтверждено, что структура популяции вируса АЧС на Северном Кавказе и в Закавказье, генетически однородна [160, 244, 285, 378, 417]. Несмотря на различия в клинике, наблюдаемый симптомокомплекс в подавляющем большинстве случаев был патогномичен для острой формы заболевания. Ни в одном из клинических случаев инфекции животные не выживали, а характер патологоанатомических изменений во внутренних органах указывал на системное поражение их организма.

4.3. Патогенность для свиней

Вирус АЧС высокопатогенен для европейских домашних пород свиней и дикого европейского кабана. В работе использовали вирус АЧС, генотип II, вызвавший заболевание в Грузии, а затем и в соседних странах, в том числе и в Армении. Определение инфекционного титра АЧС проводили методом гемадсорбции.

Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях составляла 10^4 гемадсорбирующих единиц – ГАЕ/мл. В работе использовали 12 здоровых свиней 3-х месячного возраста (вес около 40 кг), десять из которых были инфицированы вирусом АЧС, а две служили контролем. Эвтаназия свиней проводилась согласно протоколу Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, AVMA Guidelines (Institutional Review Board/Independent Ethics Committee of the institute of Molecular Biology of NAS, 1RB00004079).

Результаты диагностики АЧС в Армении проведенной в НЦЖВ и ВНИИВВиМ

Место обследования		Исследовано НЦЖВ						Исследовано ВНИИВВиМ					
Область	Община	свиной	осмотр	вскрытие	проб	РГАД	проб	РПИФ	РГАД	ПЦР			
Ереванская	Кентрон	1	+	-	1	-	-	-	-	-			
Ереванская	Эребуни	1	+	-	1	-	-	-	-	-			
Ереванская	Ачапняк	1	+	+	1	+	-	-	-	-			
Ереванская	Малатия	1	+	+	1	+	-	-	-	-			
Котайкская	Мехрадзор	1	+	+	1	+	-	-	-	-			
Котайкская	Алапарс	1	+	-	1	-	-	-	-	-			
Котайкская	Ахавнадзор	1	+	+	1	+	-	-	-	-			
Котайкская	Ехвард	3	+	+	3	+	-	-	-	-			
Арагатская	Аревабуыр	1	+	-	1	-	-	-	-	-			
Арагатская	Бурастан	1	+	-	1	-	-	-	-	-			
Гегаркуникская	Дзраванк	1	+	+	1	+	-	-	-	-			
Гегаркуникская	Лчашен	4	+	+	4	+	2	+	+	+			
Лорийская	Ехегнут	2	+	+	2	+	2	+	+	+			
Тавушская	Дилижан	4	+	+	4	+	2	+	+	+			
Всего		23	23	18	23	18	6	6	6	6			

Патологоанатомические исследования проводили путем вскрытия павших и эвтаназированных животных. В инфицированных органах титр вируса в крови составлял 7-7,25lgГАЕ/мл. Максимальные титры (8lgГАЕ/мл) наблюдали в тканях, содержащих большое количество ретикулоэндотелиальных клеточных элементов – селезенке, костном мозге, печени, что согласуется с выделением в этих тканях значительных поражений.

В наблюдаемом нами варианте острой формы АЧС неоднократно наблюдали гемorragии в мышечной ткани, чаще в мышцах конечностей. Также были обнаружены гемorragии в суставах, прежде всего в крупных суставах задних конечностей. Важно отметить, что гемартрозы наблюдались не только в коленных суставах (наиболее частая локализация), но и в других крупных суставах.

Первичным местом локализации вируса являются миндалины. Присутствие вируса в лейкоцитах, начиная с 1-го дня инфекции, свидетельствует о том, что возбудитель заносится в другие ткани лейкоцитами. Появление вируса в селезенке и костном мозге через 2 дня и быстрое повышение титра вируса в этих тканях дают основание полагать, что они являются местом вторичного размножения возбудителя. Экспериментальная АЧС имела некоторые отличия от естественной формы заболевания, которая характеризовалась более быстрым возникновением ранних клинических проявлений заболевания. Патологоанатомическое исследование выявило более выраженные явления гемorragии, включая ранее не описанные при АЧС гемартрозы.

4.4. Культивирование изолятов вируса АЧС выделенных в Армении

По результатам исследований представлены результаты изучения активности изолятов вируса африканской чумы свиней через различные сроки культивирования в первичных культурах клеток. Репродукцию изолятов вируса АЧС, доставленных из Тавушской и Лорийской областей, изучали методом титрования с использованием первичных культур клеток костного мозга свиней, лимфоцитов и лейкоцитов крови свиней.

Для изучения вируса АЧС, решающим моментом является выбор изолятов вируса, в дальнейшем используемых для получения вирусосодержащего сырья культур клеток в диагностике АЧС. Чаще всего для репродукции вируса АЧС используют первичные культуры

клеток костного мозга или лейкоциты крови свиней.

Нами было проведено сравнительное изучение репродукции вируса в первичных культурах клеток ККМС, лейкоцитах и лимфоцитах крови свиней.

В исследованиях были использованы вирулентные эпизоотические изоляты “Тавуш 2007” и “Лори 2007”. Новые штаммы получены из изолята вируса, выделенного в 2007 году от больных 4-месячных подсвинков путём последовательных пассажей на ККМС.

Специфическую активность данных штаммов вируса АЧС определяли в ККМС, лейкоцитах и лимфоцитах крови свиней и выражали в клеточных культуральных инфекционных дозах.

В целях выяснения репродуктивной способности эпизоотического вируса АЧС штамма “Тавуш 2007” было проведено 10 последовательных пассажей в первичных культурах клеток ККМС, лейкоцитах и лимфоцитах крови свиней. Инкубацию вируса в культурах проводили в течение 24, 48, и 72 часов при 37°С. Титры вируса определяли по специфической гемадсорбции в одноимённых культурах клеток. Результаты титрования штаммов вируса АЧС “Тавуш 2007” и “Лори 2007” в первичных культурах клеток ККМС, лейкоцитах и лимфоцитах представлены в таблицах 28 и 29.

Таблица 28

Репродукция эпизоотического изолята вируса АЧС “Тавуш 2007” в первичных культурах клеток ККМС, лейкоцитах и лимфоцитах

Уровень пассажа вируса	Титры вируса АЧС при пассировании в культурах клеток в зависимости от времени инкубации вируса (lg ГАЕ50см ³)								
	Костный мозг (ККМС)			Лейкоциты			Лимфоциты		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
4	3,25±0,1	3,5±0,1	3,5±0,2	3,0±0,1	3,0±0,1	3,0±0,1	3,0±0,2	3,5±0,1	3,25±0,1
5	3,25±0,1	3,75±0,1	3,75±0,1	3,0±0,1	3,25±0,1	3,0±0,1	3,5±0,1	4,0±0,1	3,5±0,1
6	3,75±0,1	4,5±0,1	4,5±0,1	3,0±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,75±0,1	4,0±0,1	3,5±0,1
7	4,5±0,2	5,0±0,1	4,75±0,1	3,5±0,1	4,0±0,1	3,5±0,1	3,75±0,2	4,0±0,1	3,5±0,1
8	5,5±0,1	5,75±0,1	5,5±0,1	4,5±0,2	5,25±0,2	5,0±0,2	4,5±0,1	5,0±0,1	4,5±0,1
9	5,25±0,1	5,5±0,2	5,5±0,1	4,5±0,1	5,25±0,1	5,0±0,2	5,0±0,1	5,0±0,1	5,0±0,1
10	5,0±0,1	5,23±0,1	5,33±0,2	4,5±0,2	5,0±0,1	5,0±0,1	4,75±0,1	5,0±0,2	5,0±0,1

Результаты исследований, приведенные в таблице 28, показывают, что при заражении монослоя клеток наибольшую репродукцию вируса наблюдали в ККМС ($5,75 \pm 0,1 \lg$ ГАЕ50см³) в лейкоцитарных культурах ($5,25 \pm 0,2 \lg \lg$ ГАЕ50см³), в лимфоцитах ($5,0 \pm 0,1 \lg$ ГАЕ50см³) в 8-м пассаже через 48 часов инкубации. Установлено, что максимальное накопление вируса АЧС штамма “Тавуш 2007” в культуре первичных лимфоцитов было в через 48 часов инкубации.

Таблица 29

**Репродукция вирулентного изолята “Лори 2007” вируса АЧС
в первичных культурах клеток ККМС и ККЛ**

Уровень пассажа вируса	Титры вируса АЧС в зависимости от времени инкубации вируса(\lg ГАЕ50см ³)					
	ККМС			ККЛ (лейкоцитарных)		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
4	$3,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,2$	$3,55 \pm 0,1$	$3,25 \pm 0,1$
5	$3,75 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$
6	$4,0 \pm 0,2$	$4,85 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$4,25 \pm 0,2$	$4,01 \pm 0,1$
7	$5,5 \pm 0,1$	$5,75 \pm 0,1$	$5,25 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$4,25 \pm 0,1$
8	$5,25 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$	$4,75 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$
9	$5,0 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,2$	$4,75 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,2$
10	$5,0 \pm 0,1$	$5,25 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$4,55 \pm 0,2$	$4,75 \pm 0,1$	$4,25 \pm 0,1$

Как видно из данных таблицы 29 вирус АЧС штамма "Лори 2007" накапливался в более высоких титрах в первичной культуре (ККМС). Наибольшие его титры были зарегистрированы в 7-ом пассаже в данных клетках ($5,75 \pm 0,1 \lg$ ГАЕ50см³) через 48 часов инкубации. Соответственно на первичной культуре клеток лейкоцитов титры вируса были ниже и не превышали $5,0 \pm 0,1 \lg$ ГАЕ50см³

Таким образом, при репродукции вируса в различных культурах было отмечено, что наибольшее накопление вируса АЧС (вирулентный штамм) было зарегистрировано в 7-8-ом пассажах в ККМС через 48 часов инкубации. Титры вируса сохранялись на высоком уровне до 10-го пассажа. Культура клеток ККМС наиболее чувствительна к различным штаммам вируса АЧС, в связи с чем, проверку специфической активности штаммов вируса АЧС можно

проводить в данной культуре клеток без использования свиней, так как разница между результатами титрования вируса АЧС в первичных культурах и в организмах свиней незначительна, что делает титрование дешевле и проще.

Результаты исследования биологической активности эпизоотического штамма “Тавуш 2007” вируса АЧС при титровании с использованием различных культур клеток представлены в таблице 30.

Таблица 30

Биологическая активность эпизоотического штамма “Тавуш 2007” вируса АЧС при титровании с использованием различных культур клеток

№ опыта	Титры вируса в Ig ГАЕ50см ³	
	ККМС	ККЛС
1	3,5-3,75	3,5-3,75
2	4,0 - 4,25	3,5-3,75
3	4,25-4,5	3,75-4,0
4	4,0-4,25	3,75-4,0
5	4.0 - 4,5	3,5-3,75
6	3,5- 3,75	3,5-4,0
7	3,75-4,0	3,5-4,0
Контроль*	<2.0	<2.0

* - в качестве контроля использовали кровь здоровых свиней

После изучения культурального свойства вируса АЧС, проводили исследование периферической крови и костного мозга на терминальной стадии развития африканской чумы свиней.

Работу проводили на 3-х здоровых и 5-и зараженных вирусом АЧС свиньях весом около 40 кг. Исследовали динамику изменений популяционного состава лейкоцитов периферической крови и костного мозга свиней на терминальной стадии развития при экспериментальной инфекции, вызванной внутримышечным введением вируса АЧС.

В работе использовали вирус АЧС, генотип II, распространившийся среди домашних и диких свиней в Армении. Определение инфекционного титра АЧС проводили методом гемадсорбции. Доза вируса АЧС, используемая в опытах на свиньях, составляла 10⁴

гемадсорбирующих единиц –ГАЕ₅₀. Периферическая кровь для приготовления мазков бралась не из ушной вены, а из бедренной кости. Готовили отпечатки костного мозга здоровых и зараженных вирусом свиней. Мазки и отпечатки фиксировали в 96 % этиловом спирте и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе. Подсчитывали процентное соотношение всех нейтрофилов крови, а также клеток, выявленных при патологии. Весь материал статистически обрабатывали и с помощью t-критерия оценивали достоверность различий полученных сравниваемых значений [425].

Состав лейкоцитов периферической крови и костного мозга здоровых свиней на терминальной стадии развития АЧС представлены в таблице 31.

Таблица 31

Состав лейкоцитов периферической крови и костного мозга здоровых свиней на терминальной стадии развития АЧС

Виды клеток	периферическая кровь		костный мозг	
	Контроль	на7-е сутки	Контроль	на7-е сутки
Лимфобласты	-	13,5+4,0	18,8+3,5	23,5+2,8
Малые лимфоциты	33,8±2,8	11,6+2,1	6,9±2,6	1,2+2,7
Средние лимфоциты	18,6±2,7	4,9±1,5	1,4+0,3	1,2+0,3
Крупные лимфоциты	8,0±1,1	2,8±0,7	9,2±1,1	2,0+0,7
Реактивные лимфоциты	-	-	-	10,2±2,2
Моноциты	4,0+0,2	2,0±0,8	6,0±1,3	2,7±1,2
Монобласты	-	2,9±0,7	4,6±0,4	5,6+0,9
Эозинофилы	3,8±0,4	3,9±0,9	4,3±0,3	11,8±1,3
Базофильные гранулоциты	1,0±0,3	1,0±0,3	-	1,0±0,4
Нейтрофилы палочкоядерные	7,5±0,8	3,9±1,0	18,4+2,5	1,2±0,3
Нейтрофилы сегментоядерные	23,3±1,6	2,0±0,3	10,5+0,4	-
Эритробласты	0	5,0±0,8	19,9+1,6	5,0+1,0
Атипичные лимфоциты	0	3,9±0,6	-	6,0±0,8
Разрушенные клетки	-	44,6±3,2	-	28,6+2,8

Как видно из таблицы, в периферической крови здоровых свиней около 60% лейкоцитов составляют лимфоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы и в сумме составляют примерно 30% популяции белой крови, а на моноциты и эозинофилы приходится

около 8% клеток. Полученные нами данные хорошо согласуются с данными, приведенными в литературе, по которым соотношение лимфоцитов к нейтрофилам достигает 1,8, а по нашим данным, в норме, это соотношение не превышает 2. На терминальной стадии заболевания появляются эритробласты и атипичные лимфоциты, число каждого из которых достигает 5% популяции, около половины лейкоцитов разрушено, при этом количество лимфоцитов уменьшается втрое, но появляются лимфобласты и монобласты, которые не встречаются в норме (13,5% и 2,9% популяции, соответственно), а число нейтрофилов уменьшается в среднем в пять раз. Таким образом, к терминальной стадии инфекции на 7-е сутки в крови наблюдается достоверное снижение содержания всех клеточных элементов белой крови и значительное её омоложение.

В костном мозге здоровых свиней лимфоциты составляют около 30% популяции. Из этого числа немного меньше половины приходится на лимфобласты. Около 30% составляют нейтрофилы. При этом число палочкоядерных нейтрофилов на 40% больше чем сегментоядерных. До 20% доходит количество бластных форм эритроидных клеток. Более 11% приходится на моноцитарную популяцию, среди которых 4.6% составляют монобласты. На 7-е сутки основную массу лимфоцитов составляют лимфобласты и реактивные лимфоциты – 33,7% популяции. Последние не встречаются у здоровых особей и свидетельствуют о сильно выраженной воспалительной составляющей данного заболевания. При этом число лимфоцитов не превышает 5%. Интересно отметить, что более чем в 2 раза уменьшается число моноцитов, но при этом увеличивается количество более ранних их форм. Полностью исчезают более зрелые сегментоядерные нейтрофилы, а число палочкоядерных уменьшается до минимума 1,2% популяции. В костном мозге появляются атипичные лимфоциты, а разрушенные клетки составляют 30% популяции. Интересно отметить, что резко, более чем в 2,5 раза, возрастает количество эозинофилов, что совпадает с литературными данными о характерных очаговых эозинофильных инфильтратах в терминальной стадии заболевания. Полученные нами данные по изменению клеточного состава крови под действием АЧС можно свести к следующим характеристикам: первое – появление ранних форм клеточных элементов; второе – появление атипичных форм; третье – появление значительных количеств разрушенных клеток.

4.5. Вирулентные свойства вируса АЧС

Вирулентные свойства вируса изучали с целью доказательства типовой принадлежности изолятов, выделенных из Лорийского и Тавушского районов.

При экспериментальном изучении вариантов вируса, выделенных из изолятов, было установлено, что все антигенные варианты оказались родственными вирулентному штамму вируса II-го генотипа. Позднее различными научно-исследовательскими центрами было подтверждено, что структура популяции вируса АЧС на Северном Кавказе и в Закавказье генетически однородна [247, 248].

Активность эпизоотического штамма вируса АЧС определяли титрованием на культурах клеток путём десятикратных разведений вируса (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) в дозах 0,1 мл. В качестве контроля использовали сыворотку крови здоровых свиней.

Результаты выявления степени вирулентности представлены в таблице 32.

Таблица 32

Вирулентные свойства культурального вируса АЧС (“Тавуш” и “Лори”)

Вирус	Кол-во животных	Культуральный вирус		Титры вируса у павших животных (lg ГАЕ50 см3)	Максимальная гипертермия после заражения оС
		Титр вируса lgГАЕ50см3	Разведения вируса		
“Тавуш”	4	4,0±0,1	10^{-1}	7,5±0,15	41,0
	2	4,0±0,1	10^{-2}	7,0±0,2	41,2
	3	4,0±0,1	10^{-3}	7,75±0,1	41,2
“Лори”	4	5,0±0,1	10^{-1}	7,75±0,1	41,4
	2	5,0±0,1	10^{-2}	8,0±0,2	41,6
	3	5,0±0,1	10^{-3}	8,5±0,1	41,4
Контроль	2	-	-	н/и	-

Изученные изоляты показали, что вирус сохранял свои вирулентные свойства на различных уровнях пассажей в ККМС и в различных разведениях, вызывая заболевание на 3-4 сутки при в/м заражении и гибель всех животных на 5-10 сутки после заражения.

Титр антигена в крови и в органах зараженных животных выявляли на 10-е сутки и в титре ГАЕ₅₀/мл, специфический антиген выявляли в мазках, в отпечатках, обработанных флюоресцирующими антителами и иммуноферментным анализом, в течение всего периода болезни, в крови и во всех паренхиматозных органах.

При постановке РПИФ в цитоплазме клеток обнаруживалось специфическое флюоресцентное свечение, а при ИФА – характерное коричневое окрашивание субстрата в лунках со специфическими сыворотками и антигеном.

На основании результатов исследований, проведенных со штаммами Тавуш и Лори, были определены референс-штаммы вируса АЧС II-го генотипа, из них были изготовлены матриксные серии вируса в виде лиофилизированной крови и суспензии селезенки зараженных свиней с активностью 10^{7,5}ГАЕ₅₀/мл. Этот материал для дальнейшей работы передали в музей штаммов научного центра в качестве референс-штамма II-го генотипа.

4.6. Изучение роли диких кабанов и клещей в качестве резервуара и переносчиков вируса АЧС

В качестве предпосылок для возникновения аутохтонного цикла АЧС на территории Армении рассматривались эндемичность клещей *Ornithodoros*, а также вовлечение в эпизоотический процесс диких кабанов на Северном Кавказе [247, 248, 260]. По предварительным данным, в 2008-2009 годах среди поголовья этих животных на территории Кавказа было зарегистрировано около 47-и вспышек АЧС с вовлечением 128 особей, из которых 110 пало, а у выживших была выявлена серопозитивность [71]. На территории Армении массовый падеж диких кабанов от заболевания в естественных условиях был зарегистрирован ВФДП еще в марте 2008 года, однако, каких-либо данных, подтверждающих серопозитивность среди их поголовья, в нашем распоряжении не имелось. Поскольку к моменту рассматриваемого периода исследований в направлении выявления инфицированности клещей *Ornithodoros* вирусом АЧС в РА также не было проведено, то мы решили выяснить степень вовлечения обоих резервуарных видов в эпизоотическую цепь АЧС, оценить фактический риск формирования цикла ее трансмиссивной передачи и определить зоны, подверженные наибольшему риску формирования ее аутохтонных очагов.

Ареал обитания диких кабанов обширен, и охватывает территорию от Северной Африки до Юго-Восточной Азии. На Евразийском континенте ареал обитания дикого кабана простирается от Атлантики до Урала, в пределах которого различают несколько его подвидов. По нашим данным, на территории Кавказа и Закавказья обитает европейско-кавказский дикий кабан (*Sus scrofa attila*) [260, 350]. Первые случаи вовлечения этих животных в эпизоотический процесс АЧС были отмечены в конце 2007 года на территории Южного Федерального Округа РФ. Падеж диких кабанов от заболевания был впервые зафиксирован в ноябре на территории Шатойского района Чеченской Республики, а уже в декабре на той же территории среди поголовья этих животных была зарегистрирована вспышка инфекции. Занос АЧС в популяцию диких кабанов ЮФО РФ положил начало формированию ее аутохтонного цикла на Кавказе. На протяжении последующих месяцев АЧС была зарегистрирована среди диких кабанов на территории различных субъектов ЮФО РФ (Чеченская Республика, Республика Ингушетия, Кабардино-Балкарская Республика), что свидетельствовало об активизации аутохтонного цикла АЧС на Кавказе [71, 243, 247, 248, 249, 375].

В Армении первые случаи АЧС среди диких кабанов были зафиксированы на территории Шикаохского заповедника, расположенного в Капанском районе Сюникской области. По информации армянского представительства ВФДП, гибель отдельных особей от неизвестного заболевания отмечался еще с февраля 2008 года. Егеря подтвердили, что падеж кабанов в заповеднике фиксировался с середины февраля, однако подозрение, что животные погибают из-за болезни, появилось только в конце марта, когда инциденты стали носить массовый характер. Перед гибелью у кабанов наблюдались симптомы недомогания, сходные с теми, которые были отмечены у кабанов, павших от АЧС в Ереванском зоопарке в июле 2007 года. Сопоставление данных СКНЖ МЭБ о продолжительности инкубационного периода болезни с предполагаемой датой ее индексного случая среди диких кабанов в Шикаохском заповеднике позволяет предположить, что заражение отдельных особей в поголовье имело место в начале февраля. В этом случае процесс формирования аутохтонных очагов инфекции на территории южных районов мог завершиться к 2009 году. В пользу данного предположения свидетельствует и выявление АЧС среди кабанов на территории

приграничных с Арменией северо-западных районов Ирана в декабре 2008 года [369].

Одним из предполагаемых механизмов заноса АЧС в популяцию диких кабанов на территории Армении считается их прямой или не прямой контакт с инфицированными особями, мигрировавшими с территории Грузии или ЮФО РФ в январе 2008 года. Обычно, зимой кабаны через горные перевалы не перемещаются, однако, в отдельных случаях, бескормица может заставить их мигрировать на большие расстояния в поисках корма [19, 71]. В таком случае, чтобы достигнуть территории Шикаохского заповедника, инфицированному животному (или их группе) нужно было преодолеть достаточно мощные горные хребты при миграции как с северо-запада (Вайкский и Зангезурский), так и с северо-востока (Севанский и Мравский). Так как при острой форме заболевания дикие кабаны перемещаться на большие расстояния не могут, то переносчиками могли являться только особи, у которых оно протекало в субклинической форме или была в инкубационном периоде. Принимая во внимание гипотетичность одновременного сочетанного воздействия всех указанных факторов (холодное время года, бескормица, форма течения болезни, преодоление горных хребтов и т.д.) мы считаем развитие данного сценария маловероятным.

По нашему мнению, наиболее вероятным является их прямой или не прямой контакт диких кабанов Шикаохского заповедника с инфицированными сородичами, мигрировавшими с территории лесогорной зоны Армении (Тавуш, Лори, Арарат) или Арцаха (Мартакерт, Аскеран, Гадрут). По сравнению с Арцахом и другими областями Армении (где температура воздуха в зимнее время колеблется от -2 до -10°C), в южной части Сюника (Капанский и Мегринский районы) зима более теплая (средняя месячная температура воздуха $+0,6-1,5^{\circ}\text{C}$) и таяние снежного покрова начинается уже в первой половине февраля. Уточнение сроков сезонных миграций диких кабанов по данным ГПОИ показало, что указанный отрезок времени совпадает с периодом начала перемещения отдельных особей, а иногда и целых семей этих животных кабанов на территорию Капанского и Мегрийского районов для откорма. В таком случае, продолжительность инкубационного периода инфекции коррелирует как с предполагаемым периодом ее заноса, так и с условной датой его индексного случая. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что вспышке АЧС среди поголовья диких кабанов Шикаохского заповедника предшествовало заражение их поголовья

на территории северо-восточных районов Армении или Арцаха.

Анализируя вероятность заноса АЧС в поголовье диких кабанов на территории Сюника посредством инфицированных кабанов, мигрировавших из Тавуша, Лори или Арцаха, следует учитывать биоэкологические особенности данного вида. Семьи кабанов обычно состоят из молодых самцов, самок и детенышей (старые самцы живут отдельно). Животные ведут активный образ жизни круглый год, однако протяженность их суточного хода варьирует в зависимости от доступности корма [75]. Летом кабаны спускаются на прилежащие к населенным пунктам территории (в т.ч. и сельскохозяйственные угодья) для откорма созревающими плодами, а осенью возвращаются в необжитые человеком районы, но не выше роста лиственных лесов [19]. В теплое время года их перемещения обычно ограничиваются расстоянием в 1,5-2 км, реже 7-11 км. При наличии корма, зимой средние размеры станций кабанов составляют 2-4 км², однако при его отсутствии, молодые самцы могут совершать длительные миграционные заходы [75]. Если учесть, что протяженность суточного хода животных составляет 3-4 км, а инкубационный период при АЧС достигает до 22-ух суток, то становится очевидно, что при остром течении заболевания, кабаны могли мигрировать на территорию Сюника только с сопредельных территорий Арцаха или Ирана.

Следующим из наиболее вероятных механизмов заражения АЧС кабанов в Шикаохском заповеднике рассматривается их контакт с инфицированными домашними свиньями. На территории южных районов Сюника в теплое время года также практикуется выпас свиней на прилежащих к населенным пунктам территориях, где практически невозможно контролировать их контакты с представителями местной фауны. В таких условиях не исключается, что передача вируса вполне могла произойти посредством их прямого или непрямого контакта с дикими кабанов. Предполагается, что 8-месячный интервал между заносом заболевания в поголовье диких кабанов и выявлением первых случаев их падежа был обусловлен различными факторами (коротким инкубационным периодом, высокой летальностью, поеданием трупов павших животных дикими и бродячими плотоядными и т.д.). При низкой плотности поголовья диких кабанов указанные факторы могут явиться причиной периодической остановки механизма горизонтальной передачи инфекции в их поголовье, а следовательно – формирования аутохтонного цикла АЧС. Такое явление

наблюдалось и на территории ЮФО РФ, где плотность диких кабанов составляла меньше особи на км². По мнению экспертов ФАО, такая плотность животных является недостаточной для формирования цикла энзоотичной персистенции вируса АЧС в их поголовье посредством внутрисемейной передачи [241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250].

Принимая во внимание вышеизложенное, мы решили определить риск формирования аутохтонных очагов АЧС в пределах биологического ареала диких кабанов на территории Армении. Одним из важнейших условий обитания этих животных является лесной покров, который занимает 11,2% территории страны. По данным ГПОИ основными лесообразующими породами в Армении являются дуб (занимает 35% с верхним пределом 1500 метров н.у.м.), бук (занимает 32% с нижним пределом 800 метров н.у.м.) и граб (занимает 18%). Около 62% лесного покрова сосредоточено у северо-восточных (Тавуш и Лори), больше 35% – юго-восточных (Сюник и Вайоц Дзор) и примерно 2% – нейтральных (Котайк и Арарат) областях Армении. Согласно данным ГПОИ, основное поголовье диких кабанов было рассредоточено на территории северо-восточных и юго-восточных областей, что обусловлено обилием плодовых деревьев и кустарников в лесах Туманянского, Иджеванского, Бердского и Капанского районов. Топографическое отображение биологического ареала диких кабанов на территории указанных областей изображено на рисунках 7, 9, 11, 13 (Приложение).

Из рисунков следует, что в 2009 году, биологический ареал обитания диких кабанов на рассматриваемой нами территории составлял примерно в 14 тыс. км², где обитало около 1 тыс. особей. По данным ГПОИ, пригодным для обитания этих животных считалось только 40% территории их биологического ареала, которая, наряду с различными природными биотопами (лесолуговыми, лесными, околородными и т.д.) включала также территорию отдельных государственных заповедников (Дилижанской, Шикаохский, Горисский). По сообщениям сотрудников ГПОИ, количество особей на территории различных биотопов непостоянно и варьирует в зависимости различных факторов (миграция, отстрел, хищники и т.д.). Определенных путей передвижения животные не имеют, и в пределах границ своего биологического ареала могут встречаться в самых разнообразных местах, начиная от природных биотопов (леса, кустарниковые рощи, тростниковые заросли) и заканчивая

прилежащими к населенным пунктам сельскохозяйственными угодьями (сады, огороды).

Анализ имеющихся данных показал, что средняя плотность поголовья диких кабанов в пределах их фактического ареала обитания составляет 0,6 особей на гектар, что, с учетом экспертных оценок, не может быть достаточным для функционирования механизма внутрисемейной передачи вируса АЧС и формирования цикла его эпизоотичной персистенции в поголовье. С другой стороны, в определенных условиях уровень инфицированности диких кабанов может находиться в прямой зависимости от типа содержания домашних свиней в неблагополучных по АЧС районах [359]. В данном контексте риск формирования аутохтонного цикла заболевания на отдельных участках лесогорной зоны, представляла присущая диким кабанам приуроченность к биогеоценотическим условиям биотопов расположенных вдоль неблагополучных общин.

Мы сопоставили данные пространственного распределения неблагополучных по АЧС пунктов в лесогорной зоне с имеющимися данными о районах, где в 2008 году был возобновлен выпас свиней на территории близлежащих к общинам биотопов. Выяснилось, что во втором полугодии 2008 года домашние свиньи выпасались в 3-х районах Тавушской (Ноемберянском, Иджеванском и Бердском), в 3-х районах Лорийской (Туманянском, Гугаркском и Таширском), в одном районе Вайоц Дзорской (Ехегнадзорском) и в 2-х районах Сюникской (Горисском и Капанском) областей. Так как за исключением Таширского и Горисского, все указанные районы к моменту рассматриваемого периода считались неблагополучными по АЧС, то риск контакта инфицированных свиней с дикими кабаном (и наоборот) на отдельных их участках лесогорной зоны оценивался нами как стабильно высокий. Топографическое отображение неблагополучных по АЧС общин, где с 2008 года отмечался выпас домашних свиней на прилежащих к общинам территориях изображено на рис.8, 10, 12, 14 (Приложение).

Для определения участков, наиболее вероятного контакта домашних свиней с дикими кабаном, нами был проведен опрос фермеров и егерей на предмет мест кормежки кабанов вблизи населенных пунктов. Выяснилось, что в 2008 году отдельные особи, а иногда и группы диких кабанов подкармливались в подлесках и кустарниковых рощах, прилежащих к отдельным населенным пунктам Туманянского (6 общин), Бердского (5 общин),

Иджеванского (1 община), Ехегнадзорского (6 общин), Горисского (2 общины) и Капанского (4 общины) районов. Биоэкологические и этиологические особенности поведения диких кабанов при кормежке, позволяют предположить, что вблизи общин отдельные их особи могли иметь различные контакты с домашними свиньями, во время которых вполне мог произойти как прямой, так и посредственный обмен инфекциями и инвазиями. Степень интенсивности таких контактов обусловлена плотностью поголовья кабанов в фактическом ареале и приуроченностью отдельных особей (или групп) к биотопам на территории неблагополучных к заболеванию общин. Данные относительно плотности поголовья диких кабанов, пунктов их экологической кластеризации на территории, прилегающей к неблагополучным по АЧС общинам в лесогорной зоне приведены в таблице 33.

Из таблицы 33 следует, что к биотопам вблизи неблагополучных по АЧС областей Лорийской, Тавушской на 1 га в среднем было приурочено 0,2, Вайоц Дзорской – 0,3, а в Сюникской 0,1 особи, соответственно. Теоретически, формирование аутохтонного цикла с участием диких кабанов при таких показателях маловероятно, однако, учитывая, что экологическая кластеризация животных на территории отдельных районов выражена на популяционном уровне (около 5-и особей на 20 га), можно заключить, что условия и предпосылки для становления и развития аутохтонного цикла АЧС в лесогорной зоне имеются. При эволюции заболевания в сторону хронического течения, отдельные особи или группы кабанов могли служить как перемежающимися очагами в пределах своего биологического ареала, так и рычагами активизации эпизоотического процесса вне его. Вышеизложенное позволяет заключить, что, несмотря на низкую плотность поголовья кабанов в лесогорной зоне, к 2009 году на отдельных ее участках сохранялся определенный риск возникновения дискретных, территориально стабильных и компактных групп инфицированных животных. Поголовье диких кабанов в лесогорной зоне было распределено в непосредственной близости от неблагополучных по АЧС общин, что подтверждает высокий риск формирования аутохтонного цикла на территории отдельных биотопов. В основе данного процесса лежит популяционная изменчивость возбудителя, которая обусловлена его шифтовыми модификациями, приводящими к снижению его вирулентности и летальности инфекции в поголовье восприимчивых животных [5].

**Экологическая кластеризация диких кабанов
к отдельным общинам территории лесогорной зоны**

Неблагополучные по АЧС общины на территории лесогорной зоны				Кластеры диких кабанов	
Область	Район	Община	Площадь/ га	Особей на площади	Особей /1 га
Лорийская	Туманянский	Цахкашат	10	2	0,2
Лорийская	Туманянский	Ахпат	20	3	0,1
Лорийская	Туманянский	Техут	15	2	0,1
Лорийская	Туманянский	Шамлуг	13	3	0,2
Лорийская	Туманянский	Ахтала	25	5	0,2
Лорийская	Туманянский	Шнох	30	7	0,2
Неблагополучная по АЧС лесогорная зона области			18,8 ± 3,1	3,6 ± 1,0	0,2 ± 0,0
Тавушская	Бердский	Арцваберд	25	2	0,08
Тавушская	Бердский	Берд	10	1	0,1
Тавушская	Бердский	Чинчин	20	2	0,1
Тавушская	Бердский	Енокаван	15	3	0,2
Тавушская	Бердский	Товуз	20	4	0,2
Тавушская	Иджеванский	Севкар	15	2	0,1
Неблагополучная по АЧС лесогорная зона области			17,5 ± 2,1	2,3 ± 0,4	0,2 ± 0,0
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Шекосар	30	12	0,4
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Ворсакар	20	5	0,2
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Егехис	35	11	0,3
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Ермон	20	6	0,3
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Каласар	30	9	0,3
Вайоц Дзорская	Ехегнадзорский	Хавамеш	40	21	0,5
Неблагополучная по АЧС лесогорная зона области			29,1 ± 3,2	10,6 ± 2,3	0,3 ± 0,0
Сюникская	Горисский	Шурнух	15	2	0,1
Сюникская	Горисский	Барцраван	22	3	0,1
Сюникская	Капанский	Антарашат	15	3	0,2
Сюникская	Капанский	Арцваник	20	5	0,2
Сюникская	Капанский	Давид Бек	20	1	0,05
Сюникская	Капанский	Агарак	25	5	0,2
Неблагополучная по АЧС лесогорная зона области			19,5 ± 1,6	3,1 ± 0,6	0,1 ± 0,0
Неблагополучные территории по АЧС			21,2	5,0	0,2

Среди диких кабанов такое явление бывает обусловлено вертикальной передачей вируса от взрослых особей потомству, в результате чего его изначально выраженная гетерогенность приводит к различным формам проявления болезни среди новорожденных. С гибелью части потомства, из популяции вируса естественным образом исключаются вирулентные клоны, а у выживших животных сохраняются невирулентные, которые и начинают циркулировать в поголовье [75]. Для определения фактической степени вовлечения диких кабанов в эпизоотический процесс АЧС на территории Армении, в течение второго полугодия 2009 года нами был организован отстрел 8 диких кабанов в лесогорной зоне и их исследование на наличие вируса АЧС. Результаты исследования изображены в таблице 34.

Таблица 34

Результаты мониторинга АЧС среди диких кабанов в лесогорной зоне Армении

Исследовано проб патологического материала		Выявлено характерных признаков и поражений при помощи							
		наблюдения		вскрытия		РПИФ		ИФА	
Области	Кол-во	Положительный	Отрицательный	Положительный	Отрицательный	Положительный	Отрицательный	Положительный	Отрицательный
Тавуш	2	0	2	0	2	0	2	0	2
Лори	2	0	2	0	2	0	2	0	2
Вайоц Дзор	2	0	2	0	2	0	2	0	2
Сюник	2	0	2	1	1	1	1	1	1
Всего	8	0	8	1	7	1	7	1	7

Как видно из таблицы, вирус АЧС был обнаружен нами в одной из 8 исследованных проб патологического материала. Все отстреленные кабаны (5 самок и 3 самца) были особями в возрасте от 2-х до 3-х лет и весом от 55 до 70 кг. Согласно анамнестическим данным, перед отстрелом каких-либо признаков недомогания у животных не наблюдалось.

При вскрытии 8-и кабанов каких-либо характерных при АЧС поражений во внутренних органах не отмечалось (Приложение, Фото 8-11). В одном лишь случае были зафиксированы незначительные инфильтрации париетальных (паховых, подмышечных) и висцеральных

(селезеночных, брыжеечных) лимфатических узлов, а также небольшие воспалительные фокусы в легких. При лабораторном тестировании этого образца пробы патологического материала были получены положительные результаты. При постановке РПИФ в цитоплазме клеток обнаруживалось специфическое флуоресцентное свечение, а при ИФА – характерное коричневое окрашивание субстрата в лунках со специфическими сывороткой и антигеном. Полученные результаты позволяют заключить, что среди поголовья диких кабанов, приуроченного к территории отдельных общин Сюникской области Армении к 2010 году АЧС уже протекала хронически.

По нашему мнению, хроническое течение АЧС среди диких кабанов в лесогорной зоне Армении связано со снижением вирулентности ее вируса. Явление могло быть обусловлено как эндогенными (модификации возбудителя в результате естественного пассажирования), так и экзогенными (сочетанное влияние различных неблагоприятных условий внешней среды) факторами. На основании вышеизложенного, можно сделать заключение, что эволюция АЧС в сторону хронического течения в поголовье диких кабанов является поворотным пунктом в истории развития эпизоотического процесса АЧС на территории Армении. Данное явление имеет принципиально важное значение не только в плане возникновения подвижных (перемежающихся) очагов заболевания на территории лесогорной зоны, но и с точки зрения повышения риска формирования цикла эпизоотичной персистенции его возбудителя в поголовье домашних свиней.

Результаты ретроспективного и оперативного анализов позволяют заключить, что вовлечение диких кабанов в развитие эпизоотического процесса АЧС на территории Армении имело место уже в конце 2007 года. Смещение вектора эпизоотийных явлений из антропогенной среды в дику природу изначально вызвало массовый падеж кабанов в лесогорной зоне, однако отдельные выжившие особи положили начало процессу формирования аутохтонного цикла заболевания. Предполагается, что эволюция АЧС в сторону хронического течения среди кабанов была обусловлена как внутрисемейной передачей возбудителя, так и перезаражением отдельных особей при прямом или непрямом контакте с инфицированными домашними свиньями. Так если в 2008-2009 годах антропургические очаги продолжали “пульсировать” на территории лесогорной зоны, то уже

к 2010 году на отдельных ее участках вполне могли сформироваться аутохтонные очаги заболевания с вектором его перемещения в агроценоз посредством перемежающихся очагов.

Ареал обитания аргасовых клещей (*Argasidae*) на территории Евразийского континента обширен, и охватывает Европейскую часть РФ, Среднюю Азию и Кавказ. Семейство *Argasidae* объединяет 5 родов, в которые входят около 100 видов. Покровы аргасовых клещей кожистые, тело уплощенное, овальной формы, длиной от 3 до 30 мм. Нападают на хозяев преимущественно ночью. В голодном состоянии взрослые особи имеют сероватый или желто-бурый цвет, а после кровососания окрашиваются в лиловый. На территории бывшего СССР встречается 17 видов аргасид родов *Argas*, *Alveonasus* и *Ornithodoros*, отдельные виды которых распространены и на территории Закавказья. Учитывая особенности эпизоотологии АЧС, наибольший интерес для нас представляли клещи рода *Ornithodoros*, которые являются природными резервуарами и переносчиками инфекционных животных и человека [91, 124]. Известно, что распространенные на территории Закавказья виды *Ornithodoros* входят в группу *O.erraticus*, представители которой являются как резервуарами, так и переносчиками вируса АЧС в странах Пиренейского полуострова [234, 235]. Экспериментальным путем было установлено, что в организме клещей *O.erraticus* вирус АЧС может сохраняться более 6-и лет не теряя при этом своих биологических свойств [236, 237].

По нашим данным [125] на территории Закавказья род *Ornithodoros* представлен видами *O.verrucosus*, *O.agalactagalis* и *O.lahorensis*. Указанные виды встречаются на предгорных лугостепных и высоких (1000-1100м н.у.м.) предгорьях, предпочитая микростанции с повышенной влажностью. Селятся аргасовые клещи в различных местах (трещины в почве, щели каменных и глинобитных построек, поры животных, гнезда птиц и т.д.) и питаются кровью как сельскохозяйственных, так и диких животных и птиц [271]. Занос вируса АЧС в популяцию одного из указанных видов *Ornithodoros* существенно повысил бы риск его эндемичной персистенции по всему периметру неблагоприятной по заболеванию территории. Так как циркуляция вируса АЧС среди клещей *Ornithodoros* обусловлена как трансвариальной, так и половой передачей, то предполагалось, что при инфицировании отдельной особью, возбудитель заболевания мог бы долгое время персистировать в популяции клещей вне зависимости от ее контакта с восприимчивыми

животными. В таком случае, антропоургический и аутохтонный циклы АЧС будут функционировать на территории Армении в течение неопределенно долгого времени, а их активация будет происходить вне зависимости от воздействия антропогенных факторов.

В качестве не прямых соактантов эпизоотической цепи АЧС рассматривались иксодовые клещи (*Ixodidae*). Семейство *Ixodidae* объединяет 19 родов, в которые входят больше 650 видов. Покровы иксодовых клещей хитиновые, тело уплощенное овальной формы длиной от 1 до 10 мм. В голодном состоянии взрослые особи имеют светло-желтый или светло-коричневый цвет, а после кровососания окрашиваются в темно-коричневый или красно-черный. По имеющимся у нас данным, на территории бывшего СССР встречается больше 60-и представителей семейства *Ixodidae*, относящихся к родам *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalis* и *Dermacentor*. Представители указанных родов встречаются в разных ландшафтных зонах (отдельные виды на высоте до 3500м н.у.м.), однако видовой их состав может варьировать в зависимости от природной поясности [125]. Подобно аргасовым клещам, иксодиды также являются гнездово-норными паразитами и являются переносчиками различных инфекционных болезней сельскохозяйственных и диких животных и птиц, а также человека. На хозяев иксодовые клещи нападают преимущественно в дневное время. [228, 286].

Так как в доступной нам литературе не оказалось данных относительно передачи вируса АЧС посредством иксодовых клещей, то риск вовлечения эндемичных в Армении видов *Ixodidae* оценивается нами как гипотетический. В то же время, отдельные данные свидетельствуют, что в условиях экстенсивного свиноводства, иксодиды могут представлять определенный эпизоотический риск для восприимчивых животных и являться источниками их заражения в течение неопределенного отрезка времени [71]. Экспериментальным путем было доказано, что отдельные виды иксодовых клещей (в частности *Rhipicephalus simus* и *Amblyomma variegatum*) могут инфицироваться вирусом АЧС. Было также установлено, что у самок других видов клещей (в частности *Rhipicephalus bursa* и *Ixodes ricinus*), которые питались кровью зараженных АЧС свиней, возбудитель сохранялся до конца кладки, но потомству трансвариальным путем не передавался [60]. Вышеизложенное позволяет заключить, что напитавшиеся инфицированной кровью самки *Rhipicephalus spp.* и *Ixodes spp.*

могут представлять риск для здоровых восприимчивых животных при попадании в их желудочно-кишечный тракт в период своей репродуктивной или яйцевой диапаузы.

По имеющимся данным, наиболее распространенными видами семейств *Argasidae* и *Ixodidae* в Армении являлись *Ornithodoros lahorensis* и *Dermacentor marginatus*. Проведенный в 1985-1992 годах мониторинг циркуляции вируса клещевого энцефалита среди кровососущих членистоногих показал, что указанные виды встречаются на территории практически всех ландшафтных зон страны [88]. Для выявления степени вовлечения клещей в эпизоотический процесс АЧС, на территории лесогорной зоны нами был проведен мониторинг инвазированности свиноводческих помещений ППХ, в которых заболевание было зарегистрировано в 2007-2008 годах. В течение второго полугодия 2009 года нами было обследовано 103 ППХ. Почти во всех обследованных ППХ была зафиксирована низкая инвазированность помещений клещами (в среднем 1-2 особи на м²), с преимущественной их локализацией в трещинах стен и деревянных покрытий.

Все собранные клещи (*Ixodidae*) были исследованы на наличие вируса АЧС при помощи РПИФ, ИФА и ПЦР, однако ни в одном случае положительных результатов получено не было. Отсутствие возбудителя в организме иксодовых клещей можно объяснить как продолжительностью его сохранения при инфицировании, так и характером взаимоотношений паразитов с восприимчивыми животными. Вышеизложенное позволяет заключить, что риск формирования цикла трансмиссивной передачи АЧС существовал с момента ее заноса на территорию Армении. К 2010 году риск формирования продолжал оставаться стабильно высоким, однако вовлечение потенциальных переносчиков в эпизоотическую цепь носит теоретический характер.

4.7. Профилактика АЧС

Древнее изречение о том, что профилактика лучше лечения особенно справедливо в случае АЧС и прочих ТЗЖ. Карантин – это первая линия обороны против этих заболеваний (т.е., карантин перед отправкой живых свиней и их ввозом) совместно с управлением перевозками и контролем на границах (для живых особей и продукции). Все страны должны направлять соответствующие средства на эффективный пограничный и импортный карантин

во избежание тяжелых заболеваний скота [5, 61, 104].

Риск-анализ при АЧС должен оценивать:

- степень риска проникновения заболевания;
- вероятные механизмы проникновения АЧС и слабые места в этом отношении;
- потенциальную серьезность последствий в случае проникновения болезни в страну.

Все это служит основой для разработки и осуществления подкрепленной надлежащими ресурсами профилактической стратегии на случай АЧС.

Самый важный ресурс при профилактике АЧС – это осведомленный владелец или менеджер животных. Владельцы свиней на всех уровнях производства должны уметь распознавать АЧС и знать, что предпринять если возникли подозрения. Этого можно достичь интенсивным обучением фермеров с помощью доступных пониманию и предельно наглядных средств, которые послужат постоянным напоминанием о болезни и ее важности. Такие просветительские материалы должны иметь достаточно широкий охват для того, чтобы включать в себя как АЧС, так и прочие патологии, которые могут быть ошибочно приняты за АЧС, чтобы фермеры не оставались один на один с проблемой идентификации АЧС. Следовательно, между владельцами скота и ветслужбами должен быть установлен канал связи, по которому можно будет оповещать о высокой смертности среди свиней или любых других проблемах, выходящих за рамки повседневного опыта владельцев. Местные власти и сельскохозяйственный персонал должны быть осведомлены об АЧС и в случае необходимости играть роль посредников. Владельцы и менеджеры – единственные лица, наблюдающие животных каждый день. Следовательно, осведомленные владельцы являются единственным надежным ресурсом по ежедневному надзору за болезнями животных.

Наличие большого поголовья бесконтрольных или мало контролируемых свиней создает риск привнесения и быстрого распространения АЧС. Может иметь место значительное запоздание в распознавании заболевания и его искоренение еще больше затруднится. Возможно, наибольшая опасность заключается в том, что эти свиньи имеют доступ к останкам околелых свиней в сельской местности или к свалкам и к останкам свиней, павших от АЧС и подготовленных для потребления человеком. Должны приниматься меры, поощряющие разработку правильно построенных свинарников и снижающие

количество поедающих отбросы свиней, особенно в местах, где есть риск заноса АЧС. Хорошо известно, что простейшие меры биобезопасности препятствуют распространению инфекции, по крайней мере на уровне фермы. Группы свиноводов на всех уровнях должны прилагать все усилия к улучшению условий биобезопасности, в которых выращиваются их свиньи. Это не только делает борьбу с АЧС, КЧС и свиным цистицеркозом возможной, но и повышает продуктивность и соответственно доходность для свиноводов, содержащих небольшое поголовье. Создание свиноводческих организаций в поддержку мелких фермеров должно поощряться.

Однако следует признать, что традиционные способы содержания свиней во многих странах не изменятся завтра, и что постоянное стойловое содержание свиней означает для владельцев принятие на себя таких обязательств по кормлению, которые они не способны выполнить. До тех пор, пока не будут предложены альтернативные корма, многие свиноводы будут считать стойловое содержание экономически не эффективным. В лучшем случае можно надеяться на то, что за короткий срок осведомленные свиноводы осознают опасность утилизации трупов, требухи и останков павших свиней на свалках, равно как и опасность свободного выпаса свиней. Должна быть принята национальная политика совершенствования методов ведения свиноводства, включающая наличие доступных источников корма и ветеринарного обслуживания животных.

ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мероприятия по борьбе с эпизоотиями представляют собой сложную систему социально-экономического порядка и должны вестись постоянно всеми средствами государственно-экономического и административно-хозяйственного аппарата.

В общем комплексе противоэпизоотических мероприятий борьбы с ящуром придается особое значение, так как ящур эндемичен или периодически возникает в соседних странах Азии, что создает постоянную угрозу заноса инфекции в Армению. Так, например, зарегистрированные в нашей стране в 1998, 2000, 2001, 2002 и 2007 и 2016 годах вспышки ящура стали следствием заноса инфекции из Ирана и Турции. Именно из Турции через пограничные пастбища Дарин Дара и с.Аразап Армавирского марза на нашу территорию в разные годы были занесены вирусы типов А (1998), А(2016), Азия-1 (2000), О (2002) и О (2007 НКР).

Значительное обострение эпизоотической ситуации во многом было связано с тем, что в иммунобиологических свойствах циркулируемых вирусов произошли такие изменения, что применяемые средства активной профилактики оказались малоэффективными.

Анализ эпизоотической ситуации, результаты изучения антигенного родства изолята А№1707 (Армения/98) показали, что этот серовариант имеет ирано-турецкое происхождение. Существенные отличия изолята от вакцинного штамма А₂₂ №550 дали основание высказать мнение, что такая вакцина не сможет защитить животных от заболевания ящуром этого типа.

В дальнейшем аналогичные исследования были получены и с изолятом Азия-1 (Армения, Грузия 2000) и О (Грузия-Армения 2002). В связи с этим для противоящурных прививок в “буферной зоне” во ВНИИЗЖ получена трехвалентная вакцина из этих штаммов, адаптированных на культуре клеток ВНК-21.

При адаптации вирусов А (Армения/98), Азия-1 (2000) и О (2002) на культуре клеток ВНК-21 была получена эффективная вакцина, однако по титрам вируснейтрализующих антител они уступали вакцине из производственных штаммов.

В наших исследованиях была показана идентификация эпизоотических штаммов вируса, определена типовая и вариантная принадлежность возбудителя ящура.

Исследования по идентификации эпизоотических штаммов вируса ящура нами проводились путем изучения антигенных свойств вируса ящура и их соответствия производственным и эталонным штаммам.

В настоящих исследованиях изучали комплементсвязывающие свойства антигенов, приготовленных из вируса ящура, размноженных в различных культурах клеток. Установлено, что из трех испытанных культур тканей (ВНК-21, ПСГК-30, IB-RS-2) наиболее подходящей для размножения вируса ящура, используемого в качестве комплементсвязывающего антигена, является перевиваемая линия клеток ВНК-21. Наиболее высокие титры комплементсвязывающего антигена вируса ящура А-98, Азия-1-2000 и О-2002, размноженного в монослое суспензии клеток ВНК-21, отмечены в период 18-72 часов после инфицирования, а комбинированным способом – 12-48 часов после добавления неинфицированных клеток. Антигены, изготовленные из вируса, размноженного в клетках ВНК-21 комбинированным способом, обладали большой комплементсвязывающей активностью (до 1:10 – 1:12) по сравнению с антигенами, изготовленными из вируса, выращенного в суспензии (до 1:8 – 1:10) и монослое клеток во вращающихся сосудах (до 1:6 – 1:8). Активность в РСК антигенов из вируса, выращенного в культуре ПСГК-30, составила до 1:2-1:4. Антигены из вируса, размноженного в культуре клеток IB-RS-2, в РСК были активными в неразведенном виде.

Ликвидация ящура, как и других заболеваний сельскохозяйственных животных, требует разработки простых и надежных методов идентификации возбудителя.

Методом прямого секвенирования в ПЦР первичной структуры гена и белка VP₁ было проведено сравнительное изучение полученных изолятов, производственных штаммов и полевых изолятов. Сравнительный анализ установленных структур двух изолятов, выделенных в 1998 году в Армении, и эпизоотических изолятов, выделенных в последние годы в Турции и Иране (А-Иран-96, А-Турция-98), показал, что оба изолята идентичны между собой и отличаются от изолятов А-Турция-98, А-Турция-97 и А-Иран-96 по трем, четырем и семи нуклеотидным последовательностям, соответственно.

Для изучения антигенного родства выделенных штаммов с производственным и некоторыми эталонными и эпизоотическими штаммами вируса были постановлены реакции в соответствии с методическими указаниями по выделению и идентификации штаммов вируса ящура.

Полученные данные свидетельствуют, что вирус А№1707 “Армения/98” значительно отличается по антигенным свойствам от производственного штамма А₂₂ № 550, эталонного штамма А₅ Вестервальд и эпизоотического штамма, выделенного в Иране в 1987 году.

Исходя из полученных результатов исследования, можно констатировать, что выделенный в 1998 году на территории Армении штамм вируса А№1707 “Армения/98”, по антигенному и иммунологическому спектрам является оригинальным, в токсонимическом отношении новым, ранее неизвестным вариантом вируса ящура типа А.

Аналогичные результаты получили при исследовании изолятов “О” №1920/Армения/2002 и “О” №2041 НКР-2007. С помощью реакции связывания комплемента и реакции нейтрализации обнаружен антиген вируса ящура типа О, а также методом от ПЦР амплицировали ДНК гена VP₁ изучаемых штаммов вируса ящура.

Сравнительный анализ показал, что данный изолят вируса ящура типа О значительно отличается от производственного штамма О №194.

В дальнейшем проведено исследование патматериала от КРС, поступившего в научный центр из Ширакской области. С помощью РСК, ИФА и ПЦР в нем выявили экзотический для Армении вирус ящура типа Азия-1 (№1933/Армения/2000). Показано антигенное отличие исследуемого изолята от вакцинного штамма типа Азия-1 №48, применяемого в качестве вакцинного в РФ и Закавказье.

Таким образом, в результате исследований по изучению антигенного родства с помощью РСК по 100% гемолизу и филогенетических взаимоотношений методом нуклеотидного секвенирования показано, что эпизоотические изоляты вирусов ящура А-98, О-2002 и Азия-1-2000 значительно отличаются от вакцинных и ранее выделенных штаммов. Полученные данные следует учитывать при разработке и изготовлении новых средств вакцинопрофилактики.

На экстренных совещаниях специалистов, проведенной под эгидой ФАО и МЭБ, была выражена срочная необходимость разработки противоящурной вакцины из новых вариантов. Поэтому совместно с Всероссийским научно-исследовательским институтом защиты животных (ВНИИЗЖ) начали изучать патологические материалы, которые доставили в НИИЗЖ, где и были выделены штаммы вируса ящура, получившие название Армения/98, О-Армения-2002, О-НКР-2007 и Азия-1. После подтверждения их отличия от вирусов ящура А₂₂, О₁ и Азия-1 была проведена экспериментальная работа по подготовке производственного штамма и изготовлению противоящурной вакцины.

Настоящие исследования показали достаточную эффективность высокоиммуногенной моновалентной вакцины против вышеуказанных штаммов вируса ящура, особенно при ревакцинации, проведенной через 21 день после первой прививки.

Подводя итоги проведенной работы, необходимо подчеркнуть, что систематическое всестороннее изучение антигенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура с применением комплекса разработанных методов позволило эффективнее использовать средства специфической профилактики. Можно выразить уверенность, что полученные результаты исследований будут способствовать успешной ликвидации ящура в нашей республике.

Раннее выявление ТБЖ подразумевает в первую очередь наличие эффективной системы лабораторной диагностики. В сложившихся обстоятельствах, предварительная диагностика заболевания имела ключевое значение для принятия оперативных решений по организации противоэпизоотических мероприятий в Ноемберянском районе, где в 2007г. была зарегистрирована АЧС. Из доступных на тот момент методов, рекомендуемых для лабораторной диагностики АЧС, мы выбрали РГАД. Выбор был обусловлен высокой чувствительностью и специфичностью данной реакции, которая, несмотря на продолжительность своей постановки, рекомендовалась МЭБ в качестве одного из основных справочных методов лабораторной диагностики АЧС. В нашей ситуации преимущество РГАД заключалось также в том, что она позволяла не только диагностировать АЧС, но и дифференцировать ее от КЧС, которая считалась одной из эндемичных болезней свиней на территории Армении.

Несмотря на результаты эпизоотических исследований и предварительной диагностики, МЭБ было оповещено о неблагополучии Армении по АЧС только в конце августа 2007 года.

В сентябре объединенная миссия ЕС/ФАО/МЭБ провела предварительную оценку эпизоотической ситуации по АЧС на территории Армении и представила ГСБПП пакет рекомендаций по исполнению экстренных мер для предотвращения ее дальнейшего распространения.

До конца 2007 г. мы продолжали отслеживать развитие эпизоотической ситуации по АЧС в соответствии с поступающими оповещениями о заболевании свиней. Во второй половине октября образцы проб были направлены также в ГНУ ВНИИВВиМ, и при посредничестве ФАО в институт Фридриха Леффлера FLI (Реимс, Германия) для постановки окончательного диагноза. К концу месяца ВНИИВВиМ оповестил ГСБПП о подтверждении диагноза посредством РПИФ, ПЦР и РГАД, а институт FLI подтвердил диагноз на основании ПЦР. После постановки окончательного диагноза начали изучать биологические свойства вируса АЧС (патогенность, культивирование, антигенность).

Изученные нами изоляты АЧС показали, что вирус сохранял свои вирулентные свойства на различных уровнях пассажей в ККМС, вызывая заболевание на 3-4 сутки при в/м заражении и гибель всех животных на 5-10 сутки после заражения.

На основании результатов исследований, проведенных со штаммами “Тавуш” и “Лори”, были определены референс-штаммы вируса АЧС II-го генотипа, из них были изготовлены матриксные серии вируса в виде лиофилизированной крови и суспензии селезенки зараженных свиней с активностью $10^{7,5}$ ГАЕ_{50/мл}. Этот материал для дальнейшей работы передали в музей штаммов НЦЖВ в качестве референс-штамма II-го генотипа.

Кроме вышеуказанных исследований изучали роль диких кабанов и кровососущих членистоногих в качестве резервуара вируса АЧС и их переносчиков.

В Армении первые случаи АЧС среди диких кабанов были зафиксированы на территории Шикаохского заповедника, расположенного в Капанском районе Сюникской области. Одним из предполагаемых механизмов заноса АЧС в популяцию диких кабанов на территорию Армении считается их прямой или не прямой контакт с инфицированными особями, мигрировавшими с территории Грузии или ЮФО РФ в январе 2008 года.

Анализируя вероятность заноса АЧС в поголовье диких кабанов на территории Сюника посредством инфицированных кабанов, мигрировавших из Тавуша, Лори или Арцаха, следует учитывать биоэкологические особенности данного вида.

Следующим из наиболее вероятных механизмов заражения АЧС кабанов в Шикаохском заповеднике рассматривается их контакт с инфицированными домашними свиньями. Для определения участков, наиболее вероятного контакта домашних свиней с дикими кабанями, нами был проведен опрос фермеров и егерей на предмет мест кормежки кабанов вблизи населенных пунктов. Выяснилось, что отдельные особи, а иногда и группы диких кабанов подкармливались в подлесках и кустарниковых рощах, принадлежащих к отдельным населенным пунктам.

Все вышеизложенные данные позволяют предположить, что в дальнейшем АЧС может охватывать новые территории Армении, оказывая все более и более негативное влияние на свиноводческую отрасль нашей республики. Поэтому на сегодняшний день основная задача, стоящая перед ветеринарными специалистами, сводится к всесторонней характеристике возбудителя АЧС, детальному изучению морфологии, основных свойств вируса, патогенеза инфекции, разработке средств профилактики и усовершенствованию методов диагностики и мер по недопущению возникновения и распространения болезни. Кроме того, необходим постоянный контроль со стороны ветеринарных служб, скоординированная работа всех ведомств, задействованных в свиноводческой отрасли, особенно руководителей свиноферм, а также частных лиц, занимающихся разведением свиней.

ВЫВОДЫ

1. С помощью ПЦР и нуклеотидного секвенирования изучен антигенный спектр вирусов ящура А-98 (Армения), А-2016, О №1920 (Армения 2002), О №2041 НКР-2007 и Азия №1933 (Армения 2000) в сравнении с другими штаммами. Сравнительный анализ показал, что эти изоляты значительно отличаются от производственных штаммов А₂₂№550, О №194, Азия1 №48 и депонированы в “НЦОАРБПП” ГНКО
2. Определены оптимальные условия выращивания вируса ящура типов О, А и Азия-1 в монослойной культуре клеток ПСГК-30 и ВНК-21 при культивировании, обеспечивающие максимальное накопление вируса ящура до 7.6-7.9 log ТЦД₅₀/мл и КС-антигена до 1:2-1:4 в 0,4 мл.
3. На примере вирусов ящура, адаптированного к организму 2-3 дневных крольчат и к суспензионной культуре клеток ВНК-21, показана вирулицидная активность олигомера 2-аминоэтил этиленимина (димера этиленимина, АЭЭИ)
4. Экспериментальная противоящурная вакцина из штамма Армения/98 при испытании на крупном рогатом скоте показала достаточно высокую иммуногенность против гомологичного вируса, не уступающую вакцине из штамма А₂₂ №550.
5. Показана возможность применения сорбированных и эмульсионных экспериментальных вакцин из КВЯ типа О №1920/Армения/2002, прививная доза которой содержала 8,9 ПД₅₀ КРС, что свидетельствует о высокой активности вакцины против заражения вирусом ящура типа О №2041 НКР.
6. Эмульсионная и сорбированная вакцина из КВЯ Азия-1/Армения 1933-2000, при использовании ее для иммунизации КРС и свиней, индуцировала высокий титр ВНА против штамма вируса ящура Азия-1 № 1737/Грузия/2000 ($6,0 \pm 0,58 \log_2$) и защищала животных от контрольного заражения штаммом вируса ящура Азия №1737/Грузия/2000.
7. При помощи генотипирования с использованием штамм-специфичных ПЦР-праймеров было установлено, что вспышки АЧС в Армении были вызваны вирулентным ее вирусом II-го генотипа, аналогичному выделенному на территории Грузии в 2007г..

8. На первичных культурах клеток ККЛ и ККМС получены штаммы вируса АЧС “Тавуш 2007” и “Лори 2007”, которые были депонированы в банке патогенных микроорганизмов “НЦОАРБПП” ГНКО.
9. Наибольшую репродукцию изолятов вируса АЧС, доставленных из Тавушской и Лорийской областей при заражении монослоя клеток наблюдали в ККМС ($5,75 \pm 0,2$ IgГAE50см³) в 7-ом и 8-ом пассажах через 48 часов инкубации.
10. Среди домашних свиней и диких кабанов на территории Армении заболевание протекает в острой или подострой формах, которое не всегда сопровождается типичными для АЧС клиническими признаками и посмертными изменениями, что иногда не позволяет своевременно диагностировать заболевание и принимать меры по ликвидации очага инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования нами подготовлены и утверждены :

2. Инструкция по предупреждению и ликвидации ящура с/х животных (приказ № 419-Ն, 16.07.2013);
3. Инструкция по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней в Республике Армения (приказ № 423-Ն, 16.07.2013);
4. ТУ РА 03506324.3427-2003 по приготовлению универсальной одновалентной и поливалентной вакцин “А”, “О”, “Азия-1”
5. ТУ РА 03506324.3425-2003 по приготовлению поливалентной вакцины против ящура типов “А”, “О”, “Азия-1”
6. ТУ РА 39064849.4704-2006 по применению раствора 2-аминоэтил этиленимина (димер этиленимина) для инактивации вируса ящура.
7. Установлена первичная структура участка генома вируса ящура типов А-98, А-2016, О-2002, О-НКР-2007 и Азия-1-2000 и доказано, что эти изоляты значительно отличаются от производственных штаммов А22№550, О№194 и Азия-1 №48.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилов В.М., Байбиков Т.З., Герасимов В.Н. Обострение эпизоотической ситуации по ящуру в Азии // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасным, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: Сб. статей межд. научно-практ. конф. к 75-летию со дня рождения И.А. Бакулова. – Покров, 2000. – С. 47-49.
2. Антонюк В.П., Дарда П.Н., Ростовцева И.А., Сорвачев К.В., Козин В.А., Носов И.И. Результаты серологической идентификации эпизоотических штаммов вируса ящура// Труды ГНКИ. – 1969, т. XVI. – С. 95-98.
3. Аншба Э.А., Герасимов В.Н., Кукушкин С.А., Власов Н.А. Клиническое проявление и патологоанатомические признаки африканской чумы свиней в Республике Абхазия// Труды Федерального центра охраны здоровья животных: материалы Международ. науч. конф. “Инфекционная патология животных”, посвященной 50-летию ФГУ “ВНИИЗЖ” / Т.VI. - Владимир: изд-во “Транзит – ИКС”, 2008. – С.121-127.
4. Базадзе Ц.В. Антигенные свойства некоторых штаммов вируса ящура//Ветеринария. – 1971, № 9. – С. 34-35.
5. Бакулов И.А., Макаров В.В. Проблемы современной эволюции африканской чумы свиней //Вестник Сельскохозяйственной Науки. - 1990, №3. – С.46-55.
6. Балашов Ю.С. Роль морфологических особенностей кровососущих членистоногих в передаче возбудителей инфекций//Паразитологический сборник. – 1984, вып. 32. – С. 22-42.
7. Балышев В.М., Книзе А.В., Цыбанов С.Ж. География АЧС и типовая гетерогенность возбудителя болезни//Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе: Тезисы докладов МВА им. К.И. Скрябина, 1999. – С. 92-94.
8. Белик Е.В., Гусев М.Н., Манин Б.Л., Михалишин В.В., Михалишин Д.В. Сравнение двух популяций клеток ВНК 21/2-17 в процессе производства противоящурных вакцин//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010.- том VIII. – С. 16-25.

9. Берлизова С.В., Цюмов В.Л., Дубяга В.П. Изучение процессов фильтрации суспензии лапинизированного вируса ящура через мембранные фильтры “Владимир”// Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1980. – С. 85-86.
10. Бойко А.А., Салажев Е.Л. Препараты для профилактики и диагностики ящура// Конференция “Курская биофабрика, к 100-летию биологической промышленности России”, Курск, 1996. – С. 352-365.
11. Бойко А.А., Шуляк Ф.С. Ящур: биолого-экологический аспект проблемы. – М.: изд-во “Колос”, 1971. – 352 с.
12. Борисов В.В., Рахманов А.М. Современная эпизоотическая ситуация в мире по ящуру и его профилактика //Пробл. зооинжен. та вет. мед.: зб. наук. праць Харківської державної зоовет. академії. – Харків, 2007. – Вип. 15 (40), ч. 2, т. 1. – С. 101-106.
13. Борисов В.В., Рахманов А.М., Белик Е.В., Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Каньшина А.В., Щербаков А.В., Мищенко А.В., Мищенко В.А., Сысолякина М.В., Герасимова В.Н., Афолина Д.Н., Майорова Т.К. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2008 г.//Труды федерального центра охраны здоровья животных ФГУ “ВНИИЗЖ”. – Владимир, 2009, том VII. – С. 3-14.
14. Борисов В.В., Рахманов А.М., Камалова Н.Е., Кременчугская С.Р., Мищенко А.В., Сысолякина М.В., Фомина С.Н., Щербаков А.В. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2007г.//Труды федерального центра охраны здоровья животных ФГУ “ВНИИЗЖ”. – Владимир, 2008, том VI. – С. 34-43.
15. Борк И. Получение препаратов иммуноглобулинов, Иммунологические методы. – М., 1987. – С. 390-413.
16. Бурдов А.Н., Захаров В.М., Рахманов А.В., Дудников А.И. К новой стратегии профилактики и борьбы с ящуром//Ящур. – Владимир, 1992, ч. 1. – С. 5-14.
17. Бурдов А.Н., Захаров В.М., Дудников А.И., Михалишин В.В. К новой стратегии профилактики и борьбы с ящуром СССР//Труды межд. конф. “К новой стратегии профилактики и борьбы с ящуром”, Владимир, 1991. – С. 17-18.

18. Восканян Г.Е., Шекоян К.И., Нерсесян С.Е. Эпизоотические и иммунологические аспекты ящура у свиней в Армении//Мат. межд. науч. конференции, посвящ. 45-летию ФГУ “ВНИИЗЖ”, 30-31 октября 2003. – С. 29-31.
19. Герасимов В.Н., Кукушкин С.А., Мищенко А.В., Никифоров В.В., Аншба Э.А., Власов Н.А., Яковлев С.С., Колбасов Д.В., Балышев В.М., Куриннов В.В., Живодёров С.П. Ликвидация африканской чумы свиней в Республике Абхазия// Ветеринария. – 2008, №3. – С. 19-24.
20. Гизитдинов Н.Н., Бахтаунов Ю.Х., Велямов М.Т. и др. Питательные среды для выращивания культур клеток и вирусов // Достижения науки и техники. – 1992, № 6. – С. 22-23.
21. Гневашов В.А., Прутнова О.В., Черняев Ю.А., Михалишин В.В. Блокада рецепторов клеток антигеном вируса ящура//Межд. конференция “К новой стратегии борьбы с ящуром”, Владимир, 1991, ч. 1. – С. 82-88.
22. ГОСТ 28085-89 “Препараты биологические методы бактериологического контроля стерильности”. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – С. 10.
23. Грибанов В.Н. Об изучении типовых свойств эпизоотических штаммов вируса ящура//Труды ВИЭВ. – 1967, т. 33. – С. 220-228.
24. Груздев К.Н., Байбиков Т.З., Герасимов В.Н., Диеб В.И., Захаров В.М., Кашалова Н.Е., Караулов А.К., Кренчугская С.Р., Мищенко А.В., Мищенко В.А., Рахманов А.М., Щербаков А.В. Эпизоотическая ситуация по ящурю типа Азия-1 в России в 2005 году и анализ эффективности мер борьбы//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006, том IV. – С. 3-19.
25. Груздев К.Н., Герасимов В.Н., Байбиков Т.З., Мищенко В.А., Захаров В.М., Дуднаев В.Г., Колесников Ю.П., Решетников А.А., Яковлев Н.В., Курбанков В.Н., Самойленко С.И., Яковлев С.С. Опыт организации и проведения мероприятий против ящура в первичных очагов инфекции//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008, том VI. – С. 78-86.

26. Груздев К.Н., Захаров В.М., Рахманов А.М. Программа совместных действий по профилактике и борьбе с ящуром животных в странах СНГ//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005, том III. – С. 3-13.
27. Груздев К.Н., Захаров В.М., Рахманов А.М. Противозэпизоотические мероприятия при заносе в Россию 2005 г. ящура экзотического типа Азия-1// Мат. межд. науч.-практ. конф. “Актуальные проблемы инфекц. патологии и иммунологии животных”, Москва, 2006. – С. 66-68.
28. Груздев К.Н., Рахманов А.М. Вклад ФГУ “ВНИИЗЖ” в деятельность межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ (к 15-летию СНГ)//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007, том V. – С. 3-23.
29. Гусев А.А., Дрыгин В.В. Совершенствование диагностической работы в ветеринарных лабораториях России// Тез. докл. науч.-практ. конф. “Современные аспекты ветеринарной патологии животных”, 23-25 ноября 1998 г., Владимир. – С. 14-21
30. Гусев А.А., Захаров В.М., Шажко Ж.А. Методические указания по выявлению и идентификации вируса ящура. – Владимир, 2002. – 31с.
31. Гутира Ф., Марек И., Манингер Р., Мочи И. Частная патология и терапия домашних животных. – Москва, 1961, т. 1. – С. 480-517.
32. Дарда П.Н., Салажнов Е.Л., Антонюк В.П. Антигенные свойства вируса ящура штамма Аи//Ветеринария . – 1966, №1. – С. 20-22.
33. Дидовец С.Р., Бондаренко Г.Ф. Ящур. – 2-е изд., Киев: изд-во “Урожай”, 1974. – 215 с.
34. Диев В.И., Блотова Г.А., Муртазин И.Ф. Контроль иммуногенной активности вакцин против ящура типа Азия-1 на овцах//Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: тез. докл. конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. – Владимир, 1997. – С. 37.
35. Диев В.И., Руник В.Е., Левина В.П., Басова Д.К., Бурдейная Л.В. Совершенствование операционного контроля производства биопрепаратов//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005, том III. – С. 28-33.

36. Доценко В.В. Изготовление и исследование эффективности новых основ питательных сред для культивирования клеток и вирусов//Тезисы докладов 5-й Всероссийской конф. “Научные основы промышленного производства ветеринарных биологических препаратов”, Щелково, 1996. – С. 36-37.
37. Дудников А. И., Михалишин В. В., Гусев А.П. Противоящурная вакцина с высокими антигенными и иммуногенными свойствами// Всероссийской научно-производственной конференции “100 лет Курской биофабрике и агrobiологической промышленности России”, Курск, 1996. – С. 532-547.
38. Дудников А.И. Определение типовых и вариантовых свойств вируса ящура посредством реакции связывания комплимента и реакции деафузионной преципитации: Дисс. на соиск. уч.степени кандидата вет. наук. – Харьков, 1964. – 217с.
39. Дудников А.И., Михалишин В.В. Общие требования к производству и качеству противоящурных вакцин//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2009, том VII. – С. 35-43.
40. Дудников А.И., Михалишин В.В., Алексаян Р.Л., Шажко Ж.А., Дудников Е.К., Рахманов А.М. Способы получения высокоактивных иммунных сывороток и экстренной защиты животных//Науч. конф. “Современные аспекты вет. патологии животных”, 23-25 ноября 1998 г., Владимир. – С. 41-48.
41. Дудников А.И., Михалишин В.В., Борисов В.В., Старов С.К. Совершенствование существующих и разработка новых биологических препаратов, предназначенных для профилактики и ликвидации ящура//Российский Ветеринарный журнал. – 2008, №9. – С. 30-33.
42. Дудников А.И., Михалишин В.В., Улупов Н.А. Лапинизированная противоящурная вакцина //Мат. межд. научной конференции “Ящур: к новой стратегии борьбы с ящуром”. – Владимир, 1992. – С. 55-63.
43. Дудников С.А. Бюллетень Информационно-Аналитического Центра Россельхознадзора “Эпизоотическая ситуация в странах мира”, 2009. – Сообщение №24.

44. Дьяконов Л.П. Культуры клеток животных, Современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инфекционными патогенами//Цитология. – 1994, Т. 36, №6. – С. 503-504.
45. Дьяконов Л.П., Строкина Г.М., Конюхов А.Ф. Гидролизаты молочных, мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов//Цитология. – 1994, Т. 36, №6. – С. 522.
46. Епифанов Г.Ф., Розенталь Н.И. К характеристике вируса ящура типа А₂₂. – Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. – М., 1970, ч. II. – С. 94-95.
47. Жданова В.М., Гайдамович С.Я. Общая и частная вирусология (Руководство). – М., 1982, т. 1-2. – 1104 с.
48. Жильцов М.В., Кременчугская С.Р., Каньшина А.В., Диев В.И., Камалова Н.Е., Изучение чувствительности культур клеток и восприимчивых культур клеток и восприимчивых животных к изоляту вируса ящура типа Азия-1 №1987 (Амурский) 2005//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006, том IV. – С. 71-80.
49. Жильцова М. В., Кременчугская С.Р., Егорова А.И., Кошецын Т.Ф. Результаты изучения изолята вируса ящура типа Азия-1 №1991 (Монголия)//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007, том V. – С. 59-66.
50. Захаров В.М., Никифоров В.В., Борисов В.В. Основные тенденции распространения ящура в мире в 2005-2007гг.//Проблемы зооинженерии та. вет. медицины: зб. наук. Прац. – Харьков, 2007. – Вип. 15 (40), ч. 2, т. 1. – С. 121-125.
51. Захаров В.М., Рахманов А.М. Разработка программы по борьбе с ящуром в странах СНГ//Мат. межд. науч. конф. “Актуальные проблемы инфекционной патологии животных”, посвященной 45-летию ФГУ “ВНИИЗЖ”, 30-31 октября 2003г. – С. 14-18.
52. Захаров В.М., Спирин В.К., Гриценко А.И. и др. Антигенные свойства штамма вируса ящура типа А-Армения(98) // Тез. докл. науч.-практ. конф. “Современные аспекты ветеринарной патологии животных”, 23-25 ноября 1998 г., Владимир. – С. 68-69.

53. Камалова Н.Е. Способы получения специфических препаратов противоящурных антител для иммунохимических реакций в лабораторной диагностике ящура// Российский ветеринарный журнал. – 2008, №3. – С. 23-26.
54. Камалова Н.Е., Сысолякина М.В., Фомина С.Н. Набор для выявления противоящурных антител в ИФА – важный инструмент для оценки иммунного статуса у животных в зонах вакцинации//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008, том VI. – С. 87-93.
55. Каралова Е.М., Восканян Г.Е., Саркисян Х.В., Аброян Л.О., Аветисян А.С., Акопян Л.А., Семерджян З.Б., Закарян О.С., Арзуманян Г.А., Каралян З.А. Патология клеток лимфоидной ткани, *in vitro* инфицированных вирусом африканской чумы свиней// Вопросы вирусологии. – 2011, №1. – С. 33-37.
56. Караулов А.К., Фомина Т.А., Камалова Н.Е., Кременчугская С.Р. Результаты серомониторинга в противоящурной буферной зоне стран СНГ//Конференция молодых ученых “Достижение молодых ученых в ветеринарной практике”, Владимир, 2000. – С. 116-121.
57. Квашнин Н.П. и др. Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1983. – С. 73-75.
58. Киндяков В.И. Материалы по изучению ящура в Казахстане//Обобщающий доклад по совокупности опубликованных работ на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук. – Алма-Ата, 1971.
59. Клюкина Н.Д., Лезова Т.Н., Михалишин Д.В., Борисов А.В., Стариков В.А. Концентрирование вируса ящура методом “сорбции – элюции” для изготовления противоящурных вакцин//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир 2009, том VII. – С. 20-28
60. Коваленко Я.Р., Сидоров М.А., Бурба Л.Г. Африканская чума свиней. – М.: изд-во “Колос”, 1972. – С. 7-8, 50-51, 95-100, 153-155, 183-188.
61. Козлова Д.И., Бесхлебнов В.А. Современные проблемы африканской чумы свиней. – М.: ВНИИТЭИСХ, 1980. – С. 4-6, 30-32, 43-48.

62. Корпов В.П., Онуфриев В.П. Об антигенных различиях штаммов вируса ящура типа А// Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. – М., 1967, ч. 2. – С. 83-84.
63. Котова М.В., Мамков Н.С., Жучкова Л.Г. и др. Зависимость иммуногенности вакцины от содержания 146S вирионов в суспензии лапинизированного вируса ящура // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1983. – С. 48-49.
64. Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Жильцова М.В., Афонина Д.Н., Майорова Т.К. Результаты изучения антигенного родства изолятов вируса ящура типа А и О с производственными штаммами//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011, том IX. – С. 12-22.
65. Кременчугская С.Р., Спирин В.К., Егорова А.И., Кошецян Т.Ф., Никифоров В.В., Муминов Д.М. Результаты изучения антигенного родства эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1, выделенного в Амурской области РФ//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006, том IV. – С. 65-70.
66. Кременчугская С.Р., Щербаков А.В.,Тимина А.М., Егорова А.И., Жильцова М.В., Фомина С.Н., Борисов В.В., Диев В.И., Аноятбеков М.А., Косумбеков М.И. Изучение изолятов вируса ящура типов А, О, Азия-1, выделенных в 2002-2003 гг. в Республике Таджикистан// Российский ветеринарный журнал, вып. посвящ. 50-летию ФГУ “ВНИИЗЖ”. – Сентябрь, 2008. – С. 18-21.
67. Критерии включения болезней в список МЭБ // МЭБ. Санитарный кодекс наземных животных. – 17-е изд. – Париж, 2008, т. 1. – С. 4-7.
68. Кругликов Б.А., Штефан М.К., Тарасенко Т.Я. Изучение инфекционных свойств в штаммов вируса ящура типа О, выделенных в разные периоды эпизоотии//Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1998, ч.1. – С.77-78.
69. Куликова И.Л., Дьяконов Л.П., Жидков С.А. Культура клеток сосудов теленка и чувствительность клеток этой культуры к вирусу диареи крупного рогатого скота// Цитология. – 1992, т. 34, №9. – С. 75-78.
70. Куличенко А.Н. Актуальные вопросы практического применения геномной диагностики социально значимых инфекций// Материалы 1-й Всероссийской научно-практической конференции, 2000. – С. 69-70.

71. Куриннов В.В., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Васильев А.П., Лыска В.М., Калабеков И.М., Миколайчук С.В., Балышев В.М., Коломыцев А.А., Луницин А.В., Герасимов В.Н., Власов Н.А., Яковлев С.С. Африканская чума свиней в Российской Федерации: эпизоотология, диагностика, мониторинг болезни (февраль, 2009 г.)//“Проблемы инфекционной патологии свиней”: материалы XVII Московского Международного ветеринарного конгресса, Москва, 2009. – С. 11-14.
72. Лихачев В. Н. Африканская чума свиней. – В кн. Ф.М.Орлова “Болезни свиней”. – М.: Гос. издат. Сельскохозяйственная литература, 1958. – С. 326-327.
73. Макарадзе Л.А., Гваладзе Э.З., Чачуа Э.Г. Морфологические и физико-химические показатели периферической крови при африканской чуме свиней//Известия аграрной науки. – 2009, Том 7, №1. – С. 83-85.
74. Макаров В.В., Вишняков И.Ф., Власов Н.А., Серова А.М. Популяционная структура вируса африканской чумы свиней по признаку количественной гемадсорбции// Вопросы вирусологии. – 1991, №4. – С. 321-324.
75. Макаров В.В., Гусев А.А., Гусева Е.В., Сухарев О.И., Коломыцев А.А. Природная очаговость африканской чумы свиней//Ветеринарная Патология. – 2011, №3. – С. 9-18.
76. Методы лабораторной диагностики африканской чумы свиней, ГОСТ 28573-90 – Общероссийский классификатор стандартов, 2006. – С. 1-9.
77. Михалишин В.В., Мамков Н.С. Адьюванты и их использование//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008, том VI. – С. 340-371.
78. Михалишин В.В., Захаров В.М., Лезова Т.Н., Улупов Н.А., Шажко Ж.А., Михалишин Д.В., Нерсесян С.Е., Гусев А.А. Изучение иммуногенных свойств вируса ящура типа А, выделенного в Армении в 1998 г.// Матер. конф., посвящ. 40-летию ВНИИЗЖ “Современные аспекты ветеринарной патологии животных”, 23-25 ноября 1998, Владимир. – С. 38-41.
79. Михалишин Д.В., Беляев Н.Е., Манин Б.Л. Подбор оптимальной дозы вируса для заражения суспензии клеткой ВНК-21//Материалы международной научно-практ. конф. “Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных”, Минск 2000. – С. 154-155.

80. Муминов Д.М., Камалова Н.Е., Егорова А.И., Фомина Т.А. Эпизоотологический мониторинг по ящуру в Таджикистане //Мат. межд. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ “Актуальные проблемы инфекц. патологии животных”. – Владимир, 2003. – С. 23-27.
81. Муминов Д.М., Фомина Т.А., Егорова А.И., Камалова Н.Е., Спиринов В.К., Щербаков А.В., Захаров В.М., Аноятбеков М.А. Характеристика изолята вируса ящура типа Азия-1, выявленного в Таджикистане в 2004 году// Матер. межд. науч. конф. молодых ученых “Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекц. болезней животных”, 24-25 марта, 2004, Владимир. – С. 8-12.
82. МЭБ Международный ветеринарный кодекс. – Париж, 2002. – 511 с.
83. МЭБ Кодекс здоровья наземных животных. – Париж, 19-е изд., 2010, т. 1-2. – 846 с.
84. Нерсисян С.Е., Восканян Г.Е., Абелян К.Е., Маркосян Т.А. Эпизоотический анализ вспышек ящура в Армении за 1996-2002 г.// Международная науч. конф. посв. 45 – летию ФГУ ВНИИЗЖ.Актуальные проблемы инфекционной патологии животных Владимир 2003 г. - С. 27-29.
85. Никифоров В.В., Кременчугская С.Р., Пономарев А.П. и др. Сравнительная оценка методов концентрирования вирусосодержащей суспензии для выявления антигена вируса ящура в продуктах убоя животных//Мат. конф “Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных”, Владимир, 2004. – С. 12-15.
86. Никифоров В.В., Кременчугская С.Р., Камалова Н.Е., Фомина Т.А., Егорова А.И., Пономарев А.П. Выявление антигена вируса ящура в продуктах убоя животных// Мат. конф. “Актуальные проблемы инфекционной патологии животных”, 30-31 октября 2003 г., Владимир. – С. 38-41.
87. Носов И.И. Серологические и биологические свойства вируса ящур типа А местных эпизоотических штаммов//Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. – 1970, часть II. – С. 95.
88. Оганесян А.С. Циркуляция вируса клещевого энцефалита в Армении//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002, №1. – С. 106-108.

89. Оковытый А.С. Научные основы селекции производственных вакцинных штаммов вируса ящура//Тез. докл. конф. “Проблемы инфекционных патологий сельскохозяйственных животных”. – Владимир, 1997. – С. 45-47.
90. Онуфриев В.П., Муравьев В.К., Фомина М.С., Коропов В.Н., Чепуркин А.В. Сравнительное изучение антигенных свойств штаммов вируса ящура типов О и А// Ящур: тем. сб. работ по проблеме ящура. – Владимир, 1970. – Т. 1. – С. 351-367.
91. Павловский Е.Н., Скрынник А.Н. Некоторые биологические особенности клещей *Ornithodoros* – переносчиков клещевого возвратного тифа//Доклады Академии Наук СССР. – 1960, №3. – С. 19-22.
92. Перевозчиков В.А. //Тез. докл. X всесоюзной конф. по электронной микроскопии. – М., 1976, т. 2. – С. 70-71.
93. Поздняков А.А., Авилов В.С., Гололобова М.Т., Дьяконов Л.П., Жидков С.А., Козыренко Г.И., Поздняков Е.Л., Сюрин Б.И. Чувствительность к вирусам новых перевиваемых линий клеток//Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1976, ч. 1. – С. 103-105.
94. Посов И.И., Рахманин П.П., Морозов М.П. Изучение вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура типа А, выделенного на территории Таджикской ССР//Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. – М., 1970, часть II. – С. 93-94.
95. Рахманов А.М. Программа совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе ящуром и ее реализация//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011, том IX. – С. 29-46.
96. Рахманов А.М. Эпизоотология ящура в СССР и России и эффективность противоэпизоотических мероприятий//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008, том VI. – С. 43-64.
97. Рахманов А.М. Ящур типа Азия 1 в Иране и Турции // Ветеринария. – 2000, № 4. – С. 58-59.

98. Рахманов А.М., Белик Е.В., Борисов В.В. Выполнение программы совместных действий стран СНГ по профилактике и борьбе с ящуром животных //Ветеринария. – 2010, №9. – С. 3-7.
99. Рахманов А.М., Борисов В.В., Белик Е.В., Кременчугская С.Р. Разработка методических рекомендаций по борьбе с ящуром животных//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010, том VIII. – С. 5-15.
100. Рахманов А.М., Борисов В.В., Михалишин В.В., Кременчугская С.Р. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире и меры борьбы с ним// Ветеринария. – 2007, № 11. – С. 3-6.
101. Рахманов П.П. Организация промышленной технологии производства препаратов для профилактики и диагностики ящура на Курской биофабрике//Курск, 2006. – С. 227-301.
102. Рекомендации по организации и проведению отчуждения животных и изъятия продуктов животноводства при ликвидации очагов особо опасных болезней животных (рассмотрено и одобрено научно-техническим советом Минсельхоза России, Протокол от 5 апреля 2007г., №7) // Ветеринария. – 2007, №4. – С. 5-10.
103. Салажаев Е.Л., Бондаренко А.Ф., Белик Е.В., Глушко Б.А. Методические указания по оценке на морских свинках иммуногенной активности вакцины против ящура из вируса типа А₂₂, О, и Азия-1, выращенного в клетках ВНК-21. – М., 1990. – 5 с.
104. Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Непоклонов Е.А., Воронин Е.С., Фомина Н.В., Гринь С.А., Белоусов В.А., Мельник Н.В., Рубай Е.А., Еремец В.И., Сапергина Е.П., Ямникова С.С., Цыбанов С.Ж. Африканская чума свиней. – В кн. “Инфекционная Патология Животных” (в 2-х томах). – Москва: изд-во “Академкнига”, 2006, Том I. – С. 806-822.
105. Саркисян Х.В. Культивирование изолятов вируса африканской чумы свиней в первичных культурах клеток//Известия Аграрной Науки. – 2009, Том 7, №1. – С. 81-82.
106. Саркисян Х.В., Восканян Г.Е., Элбакян А.Л., Григорян С.Л. Иммунологенность противоящурной вакцины// Известия Государственного аграрного университета Армении. – 2012, № 4. – С. 72-74.
107. Саяпина Л.В. Определение эффективности новых диагностических тест-систем для

- индикации возбудителей особо опасных инфекций методом ПЦР//Материалы 1-й Всероссийской научно-практической конференции, 2000. – С. 11-13.
108. Сергеев В.А. Вирусные вакцины. – Киев: изд-во “Урожай”, 1993. – 368 с.
109. Сергеев В.А. Репродукция и выращивание вируса животных. – М.: изд-во “Колос”, 1976. – 304 с.
110. Сергеев В.А., Орлянкин Б.Г. Структура и биология вирусов животных. – М.: изд-во “Колос”, 1983. – 336 с.
111. Сидоркин В.А., Гаври В.Г., Егунова А.В., Убираев С.П. Болезни свиней. – М.: изд-во “Аквариум”, 2007. – С. 257-263.
112. Собко А.И., Грищенко А.И., Соколов Л.Н. Методические указания по выделению и идентификации штаммов вируса ящура. – М.: изд-во “Колос”, 1974. – 49 с.
113. Собко А.И., Овчаренко И.В., Нестерова Ю.Ф., Черняев Ю.А. Изучения антигенной родственности вируса ящура варианта А₂₂ с вариантами вируса ящура типа А//Ящур: тематический сборник работ по проблеме ящура. – Владимир, 1970, том 1. – С. 34-39.
114. Собко А.И., Соколов Л.Н., Нестерова Ю.Ф., Грищенко А.И. Результаты идентификации эпизоотических штаммов вируса ящура//Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. – Москва, 1970, ч. II. – С. 91-93.
115. Списочные болезни МЭБ. – МЭБ. Санитарный кодекс наземных животных Париж, 16-е изд., 2007. – С. 85-88.
116. Стариков В.А., Михалишин В.В., Лезова Т.Н., Борисов А.В., Михалишин Д.В. Изучение иммуногенной активности противоящурных вакцин типа Азия-1//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2009, том VII. – С. 29-34.
117. Строкина Г.М. Конструирование питательных сред для культивирования клеток животных на основе гидролизатов белков сыворотки молока//Тез. докл. всесоюзной конф. “Питательные среды и сыворотки для культивирования клеток”, Кольцово, 14-17 октя.брь 1991. – Новосибирск, 1991. – С. 12.
118. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: изд-во “Агропромиздат”. 1991. – 528 с.

119. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.Ф. Вирусные болезни животных. – М.: изд-во ВНИТИБП, 1998. – С. 846-870.
120. Сюсюкин А.А. Научно-методические подходы к паспортизации производственных штаммов вируса ящура, предназначенных для культивирования в суспензии клеток ВНК-21//Актуальные проблемы вирусологии. – Владимир, 1987, ч.1. – С. 12-13.
121. Текерлеков Л.С., Урчев К.И. Современни тенденции в эпизоотологията на шапа (обзор). – София, 1984.
122. Узюмов В.Л. Ультраструктура и физико-химические свойства вируса ящура. – Фрунзе, 1971. – 246 с.
123. Улупов В.В., Михалишин В. В., Гусев А. А., Лезова Т. М., Аминоэтиленимин – средство инаktivации инфекционности вируса ящура//Современные аспекты ветеринарой патологии животных. – Владимир, 23-25 ноябрь 1998. – С. 53-62.
124. Филлипова Н.А. Аргасовые клещи (*Argasidae*). – В кн. “Фауна СССР, Паукообразные”. – М.: Изд-во Академии наук СССР, 1966. – Том IV, вып. 3. – С. 232-234.
125. Филлипова Н.А. Иксодовые клещи (*Ixodinae*). – В кн. “Фауна СССР, Паукообразные”. – Л: изд-во “Наука”, 1977. – Том IV, вып. 3. – С. 9-55.
126. Фомина М.С., Дрягалин Н.Н., Шажко Ж.А., Онуфриев В.П. Антигенные свойства вируса ящура типа С// Ветеринария. – 1970, № 9. – С. 40-42.
127. Фомина Т.А., Спирин В.К., Егорова А.И. и др. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О №1964(Монголия)-2004//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005, том III. – С. 94-104.
128. Фомина Т.А., Спирин В.К., Щербаков А.В. и др. Результаты изучения иммунобиологических свойств эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в Закавказье//Актуальные проблемы инфекционной патологии животных . – ФГУ ВНИИ, 30-31 октября 2003 г., Владимир. – С. 32-34.
129. Харитоновна Е.Н., Луговская Н.Н., Кременчугская С.Р., Борисов В.В. Обнаружение антигена вируса ящура типа О в блокирующем варианте иммуноферментного анализа

- с использованием специфических иммуноглобулинов кролика// Ветеринария и кормление. – 2010, №6 (ноябрь-декабрь). – С. 33-35.
130. Ходокова Н.Н., Стариков В.А., Михалишин Д.В. Заражение суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 малыми дозами вируса ящура, репродуцированного в перевиваемой линии ПСГК-30//Российский ветеринарный журнал. – Сентябрь 2008 (специальный выпуск, посвященный 50-летию ФГУ ВНИИЗЖ). – С. 21-23.
131. Цупов Н.А., Дудников А.И., Михалишин В.В. Получение малообъемных концентратов из длительно хранившегося лапинизированного вируса ящура А₂₂ и изготовление из него инактивированных вакцин//Материалы научного конференции. – Владимир, 1987. – С. 94-95.
132. Шажко Ж.А., Фомина Т.А. Некоторые характеристики эпизоотических штаммов вируса ящура, изолированных в СССР //Ящур (К новой стратегии борьбы с ящуром). – Владимир, 1992, ч.1. – С. 82-96
133. Шажко Ж.А., Мищенко В.А., Камалова Н.Е. Научно-практические аспекты получения типоспецифических Ат, конъюгированных различными маркерами (получение типоспецифических диагностикумов для реакции коаггутинации)// Тез. докл. науч. конф. ВНИИИ “Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии”. – Владимир, 1987, т. 2. – С. 47-49.
134. Шажко Ж.А., Рахманов А.М., Мезришвили Л.Б. Диагностика и индикация ящура, испытание методов выявления вируса ящура и противоящурных антител при экспертизе продуктов убоя животных реконвалесцентов// Мат. конф. “Ящур (к новой стратегии борьбы с ящуром). – Владимир, 1992, ч. 1. – С. 97-109.
135. Шевцов А.А., Караулов А.К., Дудников С.А., Титов М.А., Усов А.В., Коренной Ф.И., Бардина Н.С. Анализ риска заноса и распространения африканской чумы свиней (АЧС) на территорию Российской Федерации из Закавказья (ситуация на июнь 2008). – ФГУ “ВНИИЗЖ”, Владимир, 2008. – С. 10-13.
136. Щербаков А.В., Андреев В.Г., Дрыгин В.В., Гусев А.А. Молекулярная эпизоотология ящура в России и странах СНГ//Аграрная Россия. – 2002, №2. – С. 8-11.

137. Щербаков А.В., Тимина А.М. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России и Монголии в 2010 г.//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011, том IX. – С. 5-11.
138. Щербаков А.В., Тимина А.М., Перевозчикова Н.А. Разработка ПЦР в реальном времени для обнаружения и количественного определения вируса ящура//Российский ветеринарный журнал. – Сентябрь, 2008 (специальный выпуск, посвященный 50-летию ФГУ ВНИИЗЖ). – С. 26-27.
139. Щербаков А.В., Тимина А.М., Яковлева А. С., Дрыгин В.В., Захаров В.М., Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура//Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006, том IV. – С. 20-25
140. Щербаков А.В., Яковлев А.С., Каньшина А.В., Вавилова Н.В., Фомина С.Н., Кременчугская С.Р., Мудрак Н.С. Разработка и применение иммуноферментной тест-системы для определения антитела к неструктурным белкам вируса ящура// Труды федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006, том IV. – С. 26-39.
141. Adam K.H., Strohmaier K. Isolation of the coat proteins of foot-and-mouth disease virus and analysis of the composition and N-terminal endgroups//Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1974 Nov 6; Vol. 61, №1. – P. 185–192.
142. Adlinger H.K., Stone S., Hess W., Bachrach H. Extraction of desoxiribonucleic acid from African swine fever virus//Virology. – 1966, №30. – P. 750-752.
143. Agriculture of Georgia, 2010 Statistical Publication, National Statistics Office of Georgia, 2011. – P. 59-78.
144. Agüero M., Fernandes J., Romero L., Sanches Masqarague C., Arias M., Sanches-Viscaino J. M. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever//Journal of Clinical Microbiology. – 2003, №41. – P. 4431-4434.
145. Ahl R. Genommaskierung beim Maul-und Klauenseuche-Virus und Verhalten von genommaskiertem virus bei der Termoinaktivierung//Arch. ges. virusforsch. – 1987, Bd. 21, №2. – P. 217-233.
146. Alejo A., Andres G., Salas M. L. African swine fever virus proteinase is essential for core maturation and infectivity//Journal of Virology. – 2003, №77. – P. 5571-5577.

147. Alexander F.C. Experiences with African Swine Fever in Haiti//Annals of the New-York Academy of Sciences. – 1992, Vol. 653. – P. 251-256.
148. Alexandersen S., Wernery U., Nagy P., Frederiksen T., Normann P. Dromedaries (*Camelus dromedarius*) are of low susceptibility to inoculation with foot-and-mouth disease virus serotype O//J. Comp. Pathol. – 2008; Vol. 139 (№4). – P. 187-193.
149. Alexandersen S., Quan M., Murphy C., Knight J., Zhang Z. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus.//J. Comp. Pathol. – 2003, Vol. 129, №4. – P. 268-282.
150. Anderson E.C. African swine fever: current concepts on its pathogenesis and immunology//Revue Scientific et Technique, l'Office International des Epizootics. – 1986, №5. – P. 477-486.
151. Andres G., Garcia-Escudero R., Salas R., Rodriguez J.M. Repression of African swine fever virus polyprotein p220-encoding gene leads to the icosahedral coreless particles// Journal of Virology. – 2002, №72. – P. 2654-2666.
152. Andres G., Garcia-Escudero R., Simon-Mateo C., Vinuela E. African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from endoplasmic reticulum// Journal of Virology. – 1998, №72. – P. 8988-9001.
153. Andres G., Simon-Mateo C., Vinuela E. Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220//Journal of Virology. – 1997, №71. – P. 2331-2341.
154. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report (D.Paton, Y.Li, N.Ferris, Don King, N.Knowles et al.)//January- December, 2009. – 67 p.
155. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report (J.-E. Valarcher, N.Ferris, N.J. Knowles et. al.) // January-November, 2005. – 32 p.
156. Annual OIE/FAO- FMD Reference Laboratory Network Report (N. Ferris N. Knowles, Y. Li et al.)// January – December, 2006. – 51 p.
157. Arathoon W.R., Telling R.C. Uptake of amino acids and glucose by BHK 21 clone 13 suspension cells during cell growth//Dev. Biol. Stand. – 1981, vol. 50. – P. 145-154.
158. Arias M., Escribano J.M, Sanchez-Vizcaino J.M. Persistence of African swine fever antibody reactivity on ELISA and immunoblotting assays//The Veterinary Record. – 1993,

- №8. – P. 189-190.
159. Bachrach H.L. Visualization by chilling of protein bands in polyacrylamide gels containing 8 M urea: preparation and quantitation of foot-and-mouth disease virus capsid proteins// *Anal. Biochemist.* – 1981, vol. 110, №2. – P. 349-354.
160. Balyshev V.M., Kalantayenko Yu.F., Bolgova V.M., Prodnikova E.Yu. Seroimmunological affiliation of African swine fever virus isolated in the Russian Federation//*Russian Agricultural Sciences.* – 2011, Vol.37, №5. – P. 427-429.
161. Barteling S.J., Borke J., Woortmeyer R., Thomas A. Neutralising monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus are directed towards antigenic sites on VP 1,VP 2, VP3// XVII conf. Com OIE Fievre Apht. – Paris,1-3 October, 1986. – P. 141-151.
162. Bastos A.D.S., Penrith M-L., Cruciere C., Edrich J.L., Mulchings G., Roger F., Couacy-Hymann E., Thomson G.R. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization//*Archives of Virology.* – 2003, №148. – P. 693-706.
163. Batho H., Bendixen H., Meyer-Gerbaulet H., Westergaard J., Bendixen Mr., Marchant B., Porter A., Williams J., Brown M. The EU Veterinarian: animal health, welfare & veterinary public health developments in Europe since 1957. – Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2008. – P. 153-163.
164. Bauer K., Wittmann G. Die Reaktion von plaguegezcinigten und nicht plaguegereini gten MKS-Virusstammen der fubtypen O₁, O₂ und O₃ der entsprechenden Immunseren im Kreuzneutralisations test//*Zbl. Vet. med.* – 1986, Vol. 13, №1. – P. 25-30.
165. Bedson S.P., Maitland H.B., Burbury Y.M. Further observations on Foot-and-Mouth Disease FMD (section A- Experimental studies of Immunity in guineapigs to FMD)//*J. Comp. Pathol.* - 1927, Vol. 40. – P. 5.
166. Bekkum V.J.G., Strever P.J., Bool P.H., Erenhel S. Further information Foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains//*Bull. off. int. Epizoot.* – 1996, Vol. 65, №11-12. – P. 1945-1965.
167. Benjakul S., Morzissey M. Protein hydrolysates from pacific witing solid wastes//*Agr. Food Chem.* – 1997, Vol. 45, № 9. – P. 3425-3430.
168. Boshoff C.I., Bastos A.D.S., Gerber L.J., Vosloo W. Genetic characterization of African

- swine fever viruses from outbreaks in Southern Africa (1973-1999)//*Veterinary Microbiology*. – 2007, №121. – P. 45-55.
169. Botija C.S. Reservoirs of ASFV: a study of the ASFV in arthropods by means of the haemadsorption test//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1963, №60. – P. 895-899.
170. Botija C.S. The diagnosis of ASF by the hemadsorption test, interference of the classical fever virus//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1965, №81. – P. 239-245.
171. Botija C.S. Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1970, №73. – P. 1025-1044.
172. Botija C.S., Jover F.P. African swine fever in Spain//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1961, №55. – P. 107-147.
173. Botija C.S., Jover F.P. Report on certain aspects of African swine fever in Spain in 1964//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1964, №62. – P. 453-462.
174. Boulanger P., Bannister G.L., Greig A.S., Gray D.P., Ruckerbauer G.M. Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence and other serological methods//*Bulletin de l'Office International des Epizootics*. – 1966, №66. – P. 732-739.
175. Boulanger P., Bannister G.L., Greig A.S., Gray D.P., Ruckerbauer G.M. African swine fever. The use of agar double-diffusion precipitation test for the detection of the virus in swine tissue//*Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*. – 1967, №31. – P. 12-15.
176. Bradish C.J., Brooksby J.B. Complement-fixation studies of the specificity of the interactions between components of the virus system of foot-and-mouth disease and its antibodies// *J. gen. Microbiol.* – 1980, Vol. 22, №2. – P. 405-415.
177. Breese S.S., De Boer C.J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells//*Virology*. – 1966, №28. – P. 420-428.
178. Breese S.S. Jr., Hess W.R. Electron microscopy observations of African swine fever virus haemadsorption//*Journal of Bacteriology*. – 1966, №92. – P. 272-274.
179. Breese S.S., Pan I.C. Electron microscope observations of African swine fever virus development in vero cells//*Journal of General Virology*. – 1978, Vol. 40, №2. – P. 499-502.

180. Breese S.S., Trautman R. Studies on fine structure of foot-and-mouth disease virus// J. Appl. Physics. – 1981, vol. 32. – P. 1939.
181. Breese S.S., Trautman R., Bachrach H.L. Roational symmetry in foot-and-mouth disease virus and models//Science. – 1985, vol. 150, № 3701. – P. 1303-1305.
182. Breese S.S., Trautman R., Bachrach H.L., Analysis by election microscopy and infectivity of foot-and-mouth disease virus in moving-boundary and zone ultracentrifugation//Arch. Biochem. Biophys. – 1960, vol. 87, №1. – P. 1-8.
183. Brodish C.J., Brooksby J.B., Dillon J.F., Norambuena M. Ultracentrifugal studies of the infective and complement fixing components in the virus oystem of foot-and-mouth disease// Proc. Roy. Soe. (ser. B). – 1952, vol. 140, № 898. – P. 107-127.
184. Bronsvoot B.M., Parida S., Handel I., Mcfarland S., Fleming L., Hamblin P., Kock R. Serological survey for foot-and-moth disase in wildlife in East Africa and parameter estimation of the Cedi test NSP ELISA for buffalo// Clin. Vaccine Immunol. – 2008, vol. 15, №6. – P. 1003-1011.
185. Brooks S.M., Dixon L.K., Parkhouse R.M. Assembly of African swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo//Virology. – 1996, №224. – P. 84-92.
186. Brooksby J.B. Foot-and-mouth disease as a world problem//1st Int. Conf. FMD. – New York, 1979. – P. 17-21 (Foot-and-mouth disease as a world problem and measures for its control in different regions: summary of situation in Africa. 19th World Veterinary Congress, Mexico 3, p.1202-1209).
187. Brooksby J.B. Observations on the carrier state in foot-and-mouth disease//Europ. Comm. Control FMD. – Islend, 26-29 September, 1977 (Rome, FAO 1978). – P. 103-105. (Observations on the carrier state in foot-and-mouth disease//Rep. Mtng. Res. Grp, Standing Tech. Committee, Eur. Commission Control FMD, 1967. – P. 103-105.
188. Brooksby J.B., Rogers J. Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950-1955. – In: “Methods of typing and cultivation of FMD viruses”, Paris E.E.E.C. Project, 1957. – P. 31-34 (Brooksby, J. B. & Rogers, J. Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950-1955. In: Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses, Paris O.E.E.C. Project 208, pp. 31-34).

189. Brown F. – In “Immunochemistry of viruses” (editors Regenmortel and Nevraht). – Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, The Netherlands, 1985. – P. 265-279 (Brown F.: In Immunochemistry of viruses, eds. Regenmortel and Nevraht, p.265, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, The Netherlands).
190. Brown F. The structure and multiplication of FMD virus (a review)//BOIE. – 1982, vol. 51 №5/6. – P. 949-961.
191. Brown F., Cartwright B. Fractionation of the virus of foot-and-mouth disease by chromatography on DEAE-cellulose//Biochim. Biophys. Acta. – 1989, vol. 33, №2. – P. 343-346.
192. Brown F., Crick J. Application of agar gel. Precipitin test to the study of virus of foot-and-mouth disease//Virology. – 1988, vol. 5, №1. – P. 133-134.
193. Büllow V. Von Wirksamkeitsprüfung von MKS-Formoladsorbatvakzinen an der Maus mit Hilfe der Säuglingsimmunität// Zentralblatt für Veterinärmedizin. – 1962, vol. 9 (№5). – P. 499-506.
194. Burrows R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus// J. Hyg. – 1996, vol. 64, №1. – P. 81-90.
195. Butchaiah G., Subba rao M.V., Madhusudan P., Rao B.U. Storage stalulity of foot-and-mouth disease vaccines // Rev. sei. tech. off. int. epizoot. – 1985, Vol. 4, №1. – P. 139-143.
196. Carrasco L., Chacon M., De Lara F., Martin de las Mulas J., Gomcs-Villamandos J.C., Peres J., Wilkinson P.J., Sierra M.A. Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever// Journal of Comparative Pathology. – 1996, №115. – P. 415-428.
197. Carrascosa J.L., Carazo J.M., Carrascosa A.L., Garcia N., Sanisteban A., Vinuela E. General morphology and capsid fine structure of African swine fever particles//Virology. – 1984, №132. – P. 160-172.
198. Carrascosa J.L., Del Val M., Santaren J.F., Vinuela E. Purification and properties of African swine fever virus//Journal of Virology. – 1985, №54. – P. 337-344.
199. Carrillo C., Tulman E.R., Delhon G., Carreno A., Lu Z., Vagnozzi A., Kutish G. F., Rock D. L. Comparative Genomics of Foot-and-Mouth disease virus//Journal of Virology. – May 2005, Vol 79, № 10. – P. 6487-6504.

200. Carrol A.R., Rowlands D.J., Clarke B.E. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus.// Nucl. Acids. Res. – 1984, vol. 12, № 5. – P. 2461-2472.
201. Cartwright B., Morrell D.J. Brown F. Nature of the antibody response to the foot-and-mouth disease virus particle, its 12S protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VP1// J. gen. virol. – 1982, vol. 63, №2. – P. 375-381.
202. Ceglowski W.S. Antibody response to the non-infections 7mu component of the virus of foot-and-mouth disease//Virology. – 1985, vol. 25, №2. – P. 328-330.
203. Chang A.C.Y., Zsak L., Feng Y., Mosseri R., Lu Q., Kowalski P., Zsak A., Burrage T.G., Neilan J.G., Kutish G.F., Lu Z., Laegreid W., Rock D.L., Cohen S.N. Phenotype-based identification of host genes required for replication of African swine fever virus//Journal of Virology. – 006, №80. – P. 8705-8717.
204. Cheung A. K., Küpper H. Biotechnological approach to a new foot-and-mouth disease virus vaccine// Biotechnol. Gen. Eng. Rev. – 1984, vol.1. – P. 223-259.
205. Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance//Nature. – 1987, vol. 327, №6127. – P. 482-486.
206. Colgrove G.S. Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leukocytes of pigs infected with African swine fever virus//Bulletin of Epizootic Diseases of Africa. – 1968, №16. – P. 341-343.
207. Colgrove G.S., Haelterman E.O., Coggins L. Pathogenesis of African swine fever in young pigs//American Journal of Veterinary Research. – 1969, №30. – P. 1343-1359.
208. Council of Europe. European Pharmacopoeia (4th ed.) – Strasburg, 2002.
209. Cowan K.M., Graves J.H. An apparent nonviral but infection-associated antigen in foot-and-mouth disease//Fed. Proc. – 1986, vol. 25. – P. 615.
210. Cowan K.M., Grawes J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection//Virology. – 1966, vol. 30, №3. – P. 528-540.
211. Cox B. African swine fever//Bulletin of Epizootic Diseases of Africa. – 1963, №11. – P. 147-148.

212. Dardiri A., Jedioutschig B., Taylor W. Clinical and serological response of American white-collared peccaries to African swine fever and foot-and-mouth disease//Proceedings of 68th Annual Meeting of US Animal Health Association, 1969. – P. 437-453.
213. Dawe P.S., King A.M. Point mutations in polypeptide VP1 of foot-and-mouth disease virus affect mouse virulence and BHK21 cell pathogenicity//Arch. Virol. – 1983, vol. 76, №2. – P. 117-126.
214. De Clercq K., Goris N., Barnett P.V., MacKay D.K. FMD vaccines: reflections on quality aspects for applicability in European disease control policy//Transbound Emerg. Dis. – 2008, vol. 55, №1. – P. 46-56.
215. De Paula Lyra T.M., Saraiva V.E.V., Hermida Lage G.R., Samarcos M.S.R. The eradication of African swine fever in Brazil//Revue Scientifique et Technique, l'Office International des Epizootics, 1986, №5 (3). – P. 771-787.
216. Dekker A. Relation between antibody response and protection in FMD vaccine depends on vaccine quality//Session of the research Group of the European Commission for the control of foot-and-mouth disease. – Jerez de la Frontera, Spain 29-31, October 2012.
217. Dekker A., Goris N., Jamal S.M., and Li Y. The Relation Antibody and protection after foot-and-mouth disease vaccination cannot be standardized//The Global Control of FMD-Tools, Ideas and Ideals. – Erice, Italy. 14-17 october, 2008 (open session of the Research Group of the standing Technical Committee an FMD. European commission for the control of FMD, Food and agriculture organization of the United Nations). – P. 425-428
218. Diaz A.V., Netherton C.L., Dixon L.K., Wilson A.J. African swine fever virus strain Georgia 2007/1 in *Ornithodoros erraticus* ticks//Emerging Infectious Diseases. – 2012, Vol.18, №6. – P. 1026-1028.
219. Dixon L.K. The structure and function of the African swine fever virus genome//Revue Scientifique et Technique, l'Office International des Epizootics. – 1986, №5. – P. 469-475.
220. Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., Liverani E., Nix R., Silk R., Zang F. African swine fever virus proteins involved in evading host defense systems//Veterinary Immunology & Immunopathology. – 2004, №100. – P. 117-134.

221. Dixon L.K., Costa J.V., Escibano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. Family *Asfviridae*. – In book “Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses”, M.H.V.Regenmortel, C.M.Fauquet, D.H.L.Bishop, E.B.Carestens, M.K.Estes, S.M.Lemon, J.Maniloff, M.A.Mayo, D.J.McGeoch, C.R.Pringle and R.B.F.A. Wickner (eds.), 2000. – P. 159-165.
222. Dixon L.K., Escibano J.M., Martins C., Rock D.L., Salas M.L., Wilkinson P.J. Family *Asfviridae*. – In book “Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses”, C.M.Fauquet, M.A.Mayo, J.Maniloff, U.Desselberger, L.A.Ball (eds.), 2005. – P. 135-143.
223. Doel T.R., Chong W.K. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus// Arch. Virol. – 1982, vol. 73, №2. – P. 185-191
224. Doel T.R., Mowat G. N. An international collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 2. Quantification of 146S particles.// J. Biol. Stand. – 1985 vol. 13, № 4. – P. 335-344
225. Domingo E., Sabo D., Taniguchi T., Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population.//Cell. – 1978, vol. 13, №4. – P. 735-744
226. Dubra M.S., La Torre J.L., Scodeller E.A., Denoya C.D., Vasquez C. Cores in foot-and-mouth disease virus//Virology. – 1982, vol. 116, №1. – P. 349-353
227. Durini L.A.E., Fernandez G., Mazzuca G., Fernandez Alonso A. Variability of the foot-and-mouth disease virus and its influence on the selection of strains for vaccine production in Argentina//Bol Cent Panamer Fiebre Aftosa. – 1983, №47-48. – P. 29-34
228. Edris R.G., Hess W.R. Experimental transmission of African swine fever virus by the soft ticks *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari, Ixodoidea: Argasidae)// Journal of Medical Entomology. – 1992, №29. – P. 652-656.
229. Els H., Pini A. Negative staining of nonhaemadsorbing strain of African swine fever virus// Ondestepoort Journal of Veterinary Research. – 1977, Vol. 44, №1. – P. 39-45.
230. Enjuanes L., Cubero I., Vinuela E. Sensitivity of macrophages from different species to African swine fever virus//Journal of General Virology. – 1977, №34. – P. 455-463.
231. Escibano J.M., Pastor M.J., Arias M., Sanchez-Vizcaino J.M. Confirmation of sera positive

- by ASF ELISA with the immunoblotting technique. Use of virus-induced proteins of 23(25 kDa in the development of a diagnostic kit//Medical and Veterinary Entomology. – 1990, №7. – P. 135-141.
232. Estevez A., Marques M.I., Costa J.V. Two-dimensional analysis of African swine fever proteins and proteins induced in infected cells//Virology. – 1986, №152. – P.192-206.
233. EU directives 92/18 EC, Standards and protocols in respect of the testing of veterinary medicinal products. – Ireland, 1992
234. EU EPSA Scientific Opinion on African swine fever//EPSA Journal. – 2010, №8 (3). – P. 2-4.
235. EU EFSA Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tick-borne Infections and Their Vectors in Europe and the other Regions of Mediterranean Basin//EFSA Journal. – 2010, №8 (9). – P. 12-13.
236. EU Official Journal Commission Decision of 19 November 1993 concerning certain protection measures relating to African swine fever in Portugal (93/602/EC)//Official Journal of the European Communities. – 1993, L285. – P.38-40.
237. EU Official Journal Commission Decision of 3 December 1999 concerning certain protection measures relating to African swine fever in Portugal (99/789/EC)//Official Journal of the European Communities. – 1999, L310. – P. 71-73.
238. EU Official Journal “Commission Decision of 26 May 2003 approving an African swine fever diagnostic manual (2003/422/EC)//Official Journal of the European Union. – 2003, L143. – P. 35-49.
239. EU Official Journal Council Decision 86/650/EEC of 16 December 1986 introducing a Community financial measure for the eradication of African swine fever in Spain. – 1986, December 31, L 382. – P. 5-8.
240. EU Official Journal Council Decision 89/21/EEC of 14 December 1988 derogating from prohibitions relating to African swine fever for certain areas in Spain. – 1989, January 12, Vol. 29, L 9. – P. 24-27.
241. FAO EMPRES TAD Bulletin African swine fever. – 2000, №14. – P. 15-17.
242. FAO EMPRES TAD Bulletin African swine fever. – 2008, №32. – P. 7-11.

243. FAO EMPRES TAD Bulletin African swine fever. – 2010, №36. – P.3-17.
244. FAO EMPRES TAD Bulletin Report on the molecular characterization of African swine fever virus (ASFV) samples received from Azerbaijan. – 2009, №33. – P. 17-20.
245. FAO EMPRES TAD Bulletin The impact of transboundary animal diseases in the absence of an early warning system. – 2002, №20/1. – P. 3-4.
246. FAO EMPRES WATCH Bulletin African swine fever in Georgia. –2007, June. – P. 1-5.
247. FAO EMPRES WATCH Bulletin African swine fever in the Caucasus. – 2008, April.–P. 1-8.
248. FAO EMPRES WATCH Bulletin African swine fever spread in the Russian Federation and the risk for the region. – 2009, December. – P. 1-9.
249. FAO EMPRES WATCH Bulletin FAO takes a close look at the pig sector in Eastern Europe to better understand the threats of African swine fever. – 2010, May. – P. 1-6.
250. FAO Report of the FAO/EEC expert consultation on African swine fever and classical swine fever. – FAO, Rome, 1984. – P. 1-24.
251. Firinu A., Scarano C. African swine fever and classical swine fever (hog cholera) among wild boar in Sardinia//Revue Scientifique et Technique, l'Office International des Epizootics. – 1988, №7. – P. 901-915.
252. Fless G. The present epidemiological status of African swine fever//Tierarztliche Praxis. – 1986, №14 (2). – P. 231-235.
253. Fontaine J., Mackowiak C. Types, sub-types and variants of the foot-and-mouth disease virus (study of variants)//Symposium Internat. de Lyon. Variantes et immynite dans las fievre aphteuse, 13-15 juillet 1967. – 7 p.
254. Fontaine J., Terre J., Roumiantzeff M., Dubouclard D., Bornarel P., Favre H. Methodae d'etude immunologique des variants de virus aphteux//Soc. Sc. vet. Lyon. – Feunio, 24 avril 1966
255. Foot-and-Mouth disease: Control Strategies. – Proc. Int. Symp. – France, Lyons, 2002 – Paris etc.: Elsevier, 2003. – 390 p.
256. Foot-and-Mouth disease: proceedings. – France, Strasboorg, 2003. – 107p.
257. Forss S., Strebel K., Beck E., Schaller H. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus//Nucleic Acids Res. – 1984, vol. 12, № 16. – P. 6587-6601

258. Fowler M.E. Husbandry and diseases of captive wild swine and peccaries//Revue Scientifique et Technique, l'Office International des Epizootics. – 1996, №15. – P. 141-154.
259. Fracastorius H. De Contagione et contagiosis Morvis et Curatione. – Venezia, 1946. – Bk 1, Chap.12.
260. Gabriel C., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J. P., Beer M. Characterization of African swine fever Caucasus isolate in European wild boars// Emerging Infectious Diseases. – 2011, Vol.17, №12. – P. 2342-2345.
261. Galloway I.A. Considerations of some important aspects of recent investigation on foot- and -mouth disease// Proc. 4th Int. Congr. trop. Med. Malazia. – Washington, 1948, Vol. 2. – P.1375-1385.
262. Galloway I.A. Interim report on research work of food-and mouth disease of the Research Institute Pirbright, 1952.
263. Galloway I.A. Observations on immunological and other characteristics of strains of the virus of foot-and-mouth disease with special reference to experimental methods, epizootology and methods, epizootology and methods of control including vaccination//Report submitted to Joint Meeting of the FAO of the United Nations and OIE. – Paris, May, 1950.
264. Garcia-Beato R., Salas M.L., Vinuela E., Salas J. Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA//Virology. – 1992, №188. – P. 637-649.
265. Garcia-Escudero R., Andres G, Almazan F., Vinuela E. Inducible gene expression from African swine fever recombinants: analysis of the major capsid protein p72//Journal of Virology. – 1997, №72. – P. 3185-3195.
266. Geering W.A., Penrith M-L., Nyakahuma D. Manual on the preparation of African swine fever contingency plans. – FAO Animal Health Manual, 2001, №11.
267. Gleeson L.J., Samuel A.R., Knowles N.J. Epidemiology of FMD in Southeast Asia // Symp. Proceed. FMD control strategics – Lyons, 2002. – P. 85-86.
268. Gomes-Villamandos J.C., Hervas J., Mendes A., Carrasco L., Villeda C.J. Wilkinson P.J., Sierra M.A. Pathological study of perisinusoidal unit of the liver in acute African swine fever//Research in Veterinary Science. – 1995, №59. – P. 146-151.

269. Gonzague M., Plin C., Bakkali-Kassimi L., Boutrouille A., Cruciere C. Development of an internal control for the detection of African swine fever virus by PCR//Molecular and Cellular Probes. – 2002, №16. – P. 237-242.
270. Greig A. The localization of African swine fever virus in the tick *Ornithodoros moubata porcinus*//Archiv fuer die Gesamte Virusforschung. – 1972, Vol. 39, №1-3. – P. 240-247.
271. Gugushvili G.K. Hosts of *Ornithodoros verrucosus* and *O. alaclagalis* ticks in the Georgian SSR. I. Results of the precipitation test//Medicinskaia Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni. – 1972, Vol.41, №3. – P. 259-264.
272. Hareshape J.M., Lungu S.A., Mamu F.D. A four-year survey of African swine fever in Malawi//Journal of Hygiene. – 1985, №95. – P. 309-323.
273. Holland J.J. Continuum of change in RNA virus genomes. – In “Concepts in Viral Pathogenesis”, edited by Notkins A.L., Oldstone M.B.A. – New York: Springer-Verlag; 1984. – P. 137-143.
274. International conference on the control of infectious animal disease by vaccination: Programme and Abstracts Book. – Buenos Aires, 2004. – 102 p.
275. Iyer L.M., Aravind L., Koonin E.V. Common origin of four diverse families of large eucariotic DNA viruses//Journal of Virology. – 2001, №75. – P. 11720-11734.
276. Iyer L.M., Balaji S., Koonin E.V., Aravind L. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses//Virus Research. – 2006, №117. – P. 156-184.
277. Jamal S.M., Ferrari G., Ahmed S., Normann P., Curry S., Belsham G.J. Evolutionary analysis of serotype A foot-and-mouth disease viruses circulating in Pakistan and Afghanistan during 2002-2009//J. Gen. Virol. – 2011, vol. 92, №12. – P. 2849-2864.
278. Karalyan Z., Zakaryan H., Arzumanyan H., Sargsyan Kh., Voskanyan H., Hakobyan L., Abroyan L., Avetisyan A., Karalova E. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus//BMC Veterinary Research. – 2012, №8. – P. 18.
279. King A.M., McCahon D., Newman J.W., Crowther J.R., Carpenter W.C. Electrofocusing structural and induced proteins of aphthovirus// Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1983, vol.104. – P. 219-233

280. King A.M.Q., McCahon D., Slade W.R., Newman J.I. Biochemical evidence of recombination within the unsegmented RNA genome of Aphthovirus//J. Virol. – 1982, vol. 41. – P. 66-77
281. King D.P., Dukes J.P., Reid S.M., Ebert K., Shaw A.E., Mills C. E., Boswel L., Firris N. P., Prospects for rapid diagnosis of foot-and-mouth disease in the field usin reverse transcriptase –PCR//Vet. Rec. – 2008, vol. 162, № 10. – P. 315-316.
282. King D.P., Reid S.M., Hutchings G.H., Griesson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Bastos A.D., Drew T.W. Development of a Taq Man PCR assay with internal amplification control for detection of African swine lever virus// Journal of Virological Methods. – 2003, №107. – P. 53-61.
283. Kitching R.P. Identification of foot-and-mouth disease virus carriez and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals // Rev. sci. tech. off. Int. Epiz. – 2002, v. 21, № 3. – P. 531-538.
284. Kleiboeker S.B., Scoles C.A. Pathogenesis of African swine lever virus in *Ornithodoros* ticks//Animal Health Research Review. – 2001, Vol. 2, №2. – P. 121-128.
285. Kurinnov V.V., Kolbasov D.V., Tsibanov S.Zh., Kalabekov I.I., Liska V.M., Vasiliev A.P., Novickova M.B., Strizhakova O.M., Mickolaichuk S.V., Kalantaenko Yu.F., Balushev V.M., Kolomitsev A.A., Gerasimov V.V., Anshba E.A., Yakovlev S.S., Vlasov N.A. Diagnostic and monitoring examinations during outbreaks of African swine fever in Caucasus republics in 2007 to 2008. – Report of annual meeting of National African swine fever laboratories, 2008. – P. 7-13.
286. Labuda M., Nutall P. A. Viruses transmitted by ticks. – In Bowman A.S. and P. Nutall (eds.) “Ticks: biology, disease and control”, 2008. – P. 253-280.
287. Laddomada A., Patta C., Pittau G., Ruiu A., Firinu A. Epidemiology and control of African swine fever in Sardinia. – Proceeding of workshop on Community Programme for Coordination of Agricultural Research, 1993. – P.203-210.
288. Larenaudie B., Haag J., Carnero R., Ruiz Gonzalvo F. Etude des proprietes biologiques et chimiques du virus de la porcine africaine en culture lcucocytaire//Recueil de Medecine Veterinaire. – 1966, №142. – P. 903-919.

289. Lewis T., Zsak L., Burrage T.G., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G., Rock D.L. African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion mutation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine//*Journal of Virology*. – 2000, №74. – P. 1275-1285.
290. Li Y., Stirling C.M., Denyer M.S., Hamblin P., Hutchings G., Takamatsu H.H., Barnett P.V. Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost//*Vaccine*. – 2008, vol. 26, №21. – P. 2647-2556
291. Loeffler F., Frosch P. Summarischer bericht uber die ergebnisse der untersuchungen zur erforschung der maulund klauenseuche//*Zentbl Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I*. – 1897. vol. 22. – P. 257–259.
292. Lu Z., Cao Y., Bao H., Qi S., Guo J., Shang Y., Jiang T., Zhang Q., Ma J., Liu Z., Liu X., Yin H., Xie Q. Techniques developed in China for foot-and-mouth disease diagnosis//*Transbound Emerg. Disease*. – 2008, vol. 55, № 5-6. – P. 196-199.
293. Lubisi B.A., Bastos A.D.S., Dwarka R.M., Vosloo W. Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa//*Archives of Virology*. – 2005, №150. – P. 2439-2452.
294. Lucas A., Carnero R., Bresso M. Classification of African swine fever virus//*Comptes Rendus de l'Academic des Sciences*. – 1968, Vol. 266, №17. – P. 1800-1801.
295. Malmquist W.A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus//*American Journal of Veterinary Research*. – 1963, №24. – P. 450-459.
296. Malmquist W.A., Hay D. Haemadsorbtion and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures//*American Journal of Veterinary Research*. – 1960, №21. – P. 104-108.
297. Mandra C., Cartwright C., Honhold N., Plante C., Rutili D. Rapid assessment for the prevention and control of African swine fever outbreaks (10-21 September, 2007). – EC/FAO/OIE Mission Report, 2007. – P. 9-11.
298. Mason P.W., Grubman M.J., Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV//*Virus Res*. – 2003, vol. 91, №1. – P. 9-32.
299. Mason P.W., Pacheco J.M., Zhao Q.Z., Knowles N.J. Comparisons of the complete genomes of Asian, African and European isolates of a recent foot-and-mouth disease virus type O pandemic strain (PanAsia)//*J. Gen. Virol*. – 2003, vol. 84, №6. – P. 1583-1593.

300. McCahon D. The genetics of aphthovirus. Brief review// Arch. Virol. – 1981, vol. 69, №1. – P. 1-23.
301. McCahon D. The genetics of foot-and-mouth disease virus // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. – 1986, vol. 5, № 2. – P. 279-297.
302. McKercher P.D., Hess W.R., Hamdy F. Residual viruses in pork products//Applied and Environmental Microbiology. – 1978, №35. – P. 142-145.
303. McKercher P.D., Yedloutschnig R.J., Callis J.J., Murpfy R., Panina G.F., Civardi A., Bugnetti M., Form E.H., Laddomada A., Scarana C., Scatozza F. Survival of viruses in "Prosciutto di Parma" (Parma Ham)//Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. – 1987, №20. – P. 2476-2489.
304. Mebus C.A., House C., Ruiz Gonzalvo F., Pineda J.M., Tapiador J., Pire J.J., Bergada J., Yedloutschnig R.J., Sahu S., Becerra V., Sanchez-Vizcaino J.M. Survival of foot-and-mouth disease, African swine fever and hog cholera virus in in Spanish Serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulder and loin//Food Microbiology. – 1993, №10. – P. 133-143.
305. Melnick J.L., Riordan J.T. Poliomyelitis viruses in tissue culture. IV. Protein-free nutrient media in stationary and roller tube cultures//Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1952, vol. 81, №1. – P. 208-213.
306. Mingqiu Z., Qingli S., Jinding C., Lijun C., Yanfang X. Sequence analysis of the protein-coding regions of foot-and-mouth disease virus O/HK/2001//Vet. Microbiol. – 2008, vol. 130, №3-4. – P. 238-246.
307. Minutes of the Meeting on the Buffer Zone in CIS Countries held in OIE. – Paris: OIE, 29 May, 1998.
308. Moosbrugger G. A., Leunen J., Mackowiak C., Fontaine J., Roumiantzeff M. Comparative serological and immunological study of strains of foot-and-mouth disease virus type "O" isolated in Europe between 1963 and 1966 (article in French)//Bull. Off. Int. Epizoot. – 1967, vol. 67, № 5. – P. 711-729.
309. Moosbrugger G.A. Les variants du virus aphtcux. Applications pratiques pour la prophylaxies//Symposium Internat. de Lyon. Variantes et immunité dans la fièvre aphteuse, 13-15 juillet 1967.

310. Moulton J., Coggins L. Synthesis and cytopathogenesis of African swine fever virus in porcine cell cultures//American Journal of Veterinary Research. – 1968, №2. – P. 219-232.
311. Moura Nunes J.F., Vigario J.D., Terrinha A.M. Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells//Archives of Virology. – 1975, №49. – P. 59-66.
312. Murdin A.D., Doel T.R., Spier R.E. Isolation of capsid proteins of foot-and-mouth disease virus by chromatofocusing// J. Virol. Methods. – 1983, vol. 7, №4. – P. 207-216.
313. Muthukzishnan M., Singanalluz N. B., Ralla K., Villuppanoor S. A., Evaluation of FTA cards as laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR//J. Virol. Methods. – 2008, vol. 151, №2. – P. 311-316.
314. МЭБ Санитарный кодекс наземных животных. – Париж, 18-е изд., 2009, т.1-2. – 807 с.
315. Ndiritu C.G., Ouldridge E.J., Head M., Rweyemamu M.M. A serological evaluation of 1979-1982 Kenyan foot-and-mouth disease type SAT 2 viruses//J. Hyg. (Lond). – 1983, vol. 91, №2. – P. 335-341.
316. OIE Report Recommendations. – 22nd Conference of the OIE Regional Commission for Europe, 25-29 September, 2006, Lyon, France. – P. 2-5.
317. OIE Animal Health Status and disease Control Methods in Member Countries in 2001. – Paris, 2002, Part 1-3(part 1 – 180 p., part 2 – 190p., part 3 – 211 p.)
318. OIE Disease Information. – 2008, vol. 21, №№ 1-52.
319. OIE Manual of diagnostic test and vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). – Paris, 2004, 5th ed., vol. 1-2.
320. OIE Manual of Diagnostic test and vaccines for Terrestrial Animals (mammals birds and bees). – Paris, 2008, 6th ed., vol. 1.– 598 p.
321. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, African swine fever. – 2004, Section 2.8, Chapter 2.1.12. – P. 233-243.
322. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, African swine fever. – 2008, Section 2.8, Chapter 2.8.1. – P. 1069-1082.

323. OIE Manual of Diagnostic test and vaccines for Terrestrial animals (Mammals, birds and bees). – Paris, 2008, 6th ed., vol. 1-2.
324. OIE Report “World Animal Health 1989”. – 1990, part I. – P.132-133.
325. OIE Terrestrial Animal Health Code, African swine fever. – 2007, Chapter 2.6, Article 2.6.6. – P. 267-272.
326. OIE World Animal Health in 2000. – Paris, 2001, vol. 1-2. – 701 p.
327. OIE World Animal Health in 2003. – Paris, 2004, vol. 1-2. – 750 p.
328. OIE World Animal Health in 2004. – Paris, 2005, vol. 1-2. – 792 p.
329. OIE World Animal Health in 2007. – Paris, 2008. – 603 p.
330. OIE World Animal Health in 2008. – Paris, 2009, vol. 1-2. – 717 p.
331. OIE World Animal Health in 2009. – Paris, 2010, vol. 1-2. – 1049 p.
332. OIE World Animal Health in 2009. – Paris, 2011, vol. 1-2. – 1077 p.
333. OIE. Disease Information. – 2000, vol.13, № № 1-51.
334. OIE. Disease Information. – 2001, vol.14, № № 1-52.
335. OIE. Disease Information. – 2002, vol.15, № № 1-52.
336. OIE. Disease Information. – 2003, vol.16, № № 1-52.
337. OIE. Disease Information. – 2004, vol.17, № № 1-53.
338. OIE. Disease Information. – 2005, vol.18, № № 1-52.
339. OIE. Disease Information. – 2006, vol. 19, №№ 1-52
340. OIE. Disease Information. – 2007, vol. 20, №№ 1-52.
341. OIE. Disease Information. – 2009, vol. 22, №№ 1-18.
342. OIE. Disease Information. – 2009, vol. 22, №№ 1-53.
343. OIE. Disease Information. – 2010, vol. 23, №№ 1-5.
344. OIE. Disease Information. – 2010, vol. 23, №№ 1-52.
345. OIE. Disease Information. – 2011, vol. 24, №№ 1-11.
346. OIE. Disease Information. – 2014, vol. 27, №№ 1-52.
347. OIE. Disease Information. – 2015, vol. 28, №№ 1-13.
348. OIE/FAO Report “Ensuring Good Governance to Address Emerging and Re-emerging Animal Disease Threats”. – 2007. – P. 11-12.

349. OIE/FAO Report “Global Framework for the Progressive Control of Transboundary Animal Diseases (GF-TADs)”. – 2004. – P. 14-15.
350. Oliver W.L.R., Brisbin I.L.Jr., Takahashi S. The Eurasian wild pig (*Sus scrofa*). – In book “Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Action Plan” W.L.R. Oliver (ed.), 1993. – P. 112-121.
351. Oura C.A.L., Powell P.P., Anderson E., Parkhouse R.M.E. The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig//Journal of General Virology. – 1998, №79. – P. 1439-1443.
352. Oura C.A.L., Powell P.P., Parkhouse R.M.E. African swine fever: a disease characterized by apoptosis//Journal of General Virology. – 1998, №79. – P. 1427-1438.
353. Pastor M.J., Laviada M.D., Sanchez-Vizcaino J.M., Escribano J.M. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay//Canadian Journal of Veterinary Research. – 1989, №53. – P. 105-107.
354. Penrith M-L., Nyakahuma D. Recognizing African swine fever. A field manual. – FAO Animal Health Manual, №9, 2000.
355. Penrith M-L., Thomson G. R., Bastos A.D.S. African swine fever. – In book “Diseases in livestock with special reference in South Africa” J.A.W.Coetzer, G.R.Thomson, R.C.Tustin (eds.), 2nd ed., 2004. – P. 1087-1119.
356. Pereira H.G. Subtyping of foot-and-mouth disease virus//Dev. Biol. Stand. – 1977, vol. 35. – P. 167-174.
357. Perez A.M., König G., Späth E., Thurmond M.C. Variation in the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus serotype A associated with epidemiological characteristics of outbreaks in the 2001 epizootic in Argentina//J. Vet. Diagn. Invest. – 2008, vol. 20, №4. – P. 433-439.
358. Pérez Filgueira M., Wigdorovitz A., Romera A., Zamorano P., Borca M.V., Sadir A.M. Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 campos//Virology. – 2000, vol. 271, №2. – P. 234-239.
359. Perez J., Sierra M.A., Martin de las Mulas J., Fernandez A.I., Herraez P., Fernandez A. Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain//

- The Veterinary Record. – 1998, Vol. 143, №5. – P. 136-139.
360. Peritz F. J. African swine fever in Latin America. – World Animal Review. – 1980, №36. – P. 29-33.
361. Periza H. G. // Develop Biol. Standard 1977 v. 35, p. 52-55.
362. Planterose D.N., Cartwright B., Brown F. Heat-labile complement-fixing antigens in the growth-cycle of foot-and-mouth disease virus// Nature (London), 1963, Vol. 198. – P. 864-865.
363. Plowright W. African swine fever. – In book “Infectious diseases of wild mammals” J.W. Davis, L.H.Karstad, D.O.Trainer (eds.), 1981. – P. 178-190.
364. Plowright W. Sexual transmission of African swine fever in the ticks *Ornithodoros moubata porcinus* Walton//Research in Veterinary Science. – 1974, Vol.17, №1. – P. 106-113.
365. Plowright W., Perry C., Pierce M. A. Transovarial infection with the African swine fever in the argasid tick *Ornithodoros moubata porcinus* Walton//Research in Veterinary Science. – 1970, №11. – P. 582-584.
366. Plowright W., Perry C., Pierce M.A., Parker J. Experimental infection of the argasid ticks, *Ornithodoros moubata porcinus* with African swine fever virus//Archiv fuer die Gesamte Virusforschung. – 1970, Vol. 31, №1-2. – P. 33-50.
367. Plowright W., Thomson G.R., Neser J.A. African swine fever. – In book “Diseases in livestock with special reference in South Africa” J.A.W.Coetzee, G.R.Thomson, R.C.Tustin (eds.), 1994. – P. 567-599.
368. Pringle C.R., Slade W.R. Evidence of recombination between immunologically distinct strains of foot-and-mouth disease virus//Heredity. – 1986, vol. 21, №2. – P. 341.
369. Rahimi P., Sohrabi A., Ashrafihelan J., Edalal R., Alamdari M., Masoudi M., Mostofi S., Aradmanesh K. Emergence of African Swine Fever in Northwestern Iran//Emerging Infectious Diseases. – 2010, Vol. 16, №12. – P. 1946-1948.
370. Ramiro-Ibanez F., Ortega A., Brun A., Escribano J.M, Alonco C. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection//Journal of General Virology. – 1996, №77. – P. 2209-2219.

371. Report of the meeting of Expert Group on the New Variant of FMD virus type A in Iran and Turkey. – Rome, FAO, 22 April 1998.
372. Richman D. et al. Rapid viral diagnosis//J. Infect. Dis. – 1984, vol. 149, №3. – P. 289-310.
373. Robertson B.H., Grubman M.J., Weddell G.N., Moore D.M., Welsh J.D., Fischer T., Dowbenko D.J., Yansura D.G., Small B., Kleid D.G. Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12//J. Virol. – 1985, vol. 54, №3. – P. 651-660.
374. Röhrer H., Olechnowitz A.F. Maul and Klauenseuche. – Jena: Fisher, 1980. – 708 p.
375. Rolesu S., Aloï D., Chironi A., Oggiano N., Oggiano A., Puggioni G., Patta C., Farina S., Montinaro S. Geographic information systems: a useful tool to approach African swine fever surveillance management of wild pigs populations//Veterinaria Italiana. – 2007, vol. 43, №3. – P. 463-467.
376. Rouiller I., Brookes S.M., Hyatt A.D., Windsor M., Wileman T. African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum//Journal of Virology. – 1998, №72. – P. 2373-2387.
377. Rowlands D.S., Cartwright B., Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and mouth disease virus//J. Gen. Virol. – 1989, vol. 4. – P. 479-483.
378. Rowlands R.J., Michaud V., Health E., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E., Dixon L.K. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007//Research. – 2008, Vol.14, №12. – P. 1870-1874.
379. Rutilli D., Brickler G, Plante C. Assessment of African swine fever (ASF) outbreak in the Republic of Georgia (11-14th June, 2007). – EC/FAO/OIE Mission Report, 2007. – P.3-14.
380. Rweyemamu M.M. Antigenic variation in Foot-and-mouth disease: Studies based on the virus neutralization reaction // J. Biol. Standard. – 1984, vol. 12. – P. 323-327.
381. Rweyemamu M.M. Foot and mouth disease control strategies in Africa// Prevent. Vet. Med. – 1984, vol. 2. – P. 329-340.
382. Rweyemamu M.M., Hingley P. Foot-and-mouth disease virus strain differentiation: analysis of the serological date //J. Biol. Standard. – 1984, vol. 12. – P. 225-229.

383. Saiz J.C., Gonzalez M.J., Borca M.V., Sobrino F., Moore D.M. Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants.//J. Virol. – 1991, Vol. 65, №5. – P. 2518-2524.
384. Salayov E.L. Etud des souches du virus aphteux de type A//XII conf. de la commission de la Fievre Aphteuse de l'OIE. – Paris, 26-30 november 1968. – P. 105.
385. Sanchez-Viscaino V.M., Martinez-Lopez B., Martinez-Aviles M., Martins C., Boinas F., Vial L., Michaud V., Jori F., Etter E., Albina E., Roger F. Scientific Review on African Swine Fever. – 2009, EFSA, GFP/EFSA/AHAW/2007/2 . – P. 44-58.
386. Sanchez-Vizcaino J.M. African swine fever. – 9th edition of “Diseases of swine”, 2006, Chapter 13. – P. 291-298.
387. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1977, Vol. 74, №12. – P. 5463-5467.
388. Schulze P., Gralheer H. Untersuchungen zur Feinstruktur des Maul-und Klauenseuchevirus// Arch. Exp. Veterinärmed. – 1964, vol. 18. – P. 1449–1458.
389. Schulze P., Gralheer H. Visualization of capsomeres of foot-and-mouth disease virus (by electron microscopy, using negative staining)//Acta virol. Prague. – 1984, vol. 8, №5. – P. 473.
390. Sellers R.F., Burrows R., Garland A.J., Greig A., Parker J. Exposure of vaccinated bulls and steers to airborne infection with foot-and-mouth disease//Vet. Rec. – 1969, vol. 85, №7. – P. 198-199.
391. Sobrino F., Dávila M., Ortín J., Domingo E. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture// Virology. – 1983, Vol. 128, №2. – P. 310-318.
392. Sobrino F., Palma E.L., Beck E., Dávila M., de la Torre J.C., Negro P., Villanueva N., Ortín J., Domingo E. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations//Gene.– 1986, vol. 50, № 1-3. – P. 149-159.
393. Statistical yearbook of Armenia, 2007. – P. 270-290.
394. Statistical yearbook of Armenia, 2008. – P. 271-291.
395. Statistical yearbook of Armenia, 2009. – P. 271 -291.

396. Statistical yearbook of Armenia, 2010. – P. 271 -291.
397. Statistical yearbook of Armenia, 2011. – P. 294-314.
398. Steiger Y., Ackermann M., Mettraux C., Kihm U. Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction//Journal of Clinical Microbiology. – 1992, №30. – P. 1-8.
399. Stone S.S., Hess W.R. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs//American Journal of Veterinary Research. – 1967, №28. – P. 475-481.
400. Sumption K. Lessons and issues arising from recent FMD control experience in the region // International Control of FMD: Tools Trends and Perspectives open Sess. Group Stand. Techn. Comm. Europ Commiss. Control FMD. – Paphos, Cyprus, 2006. – 6 p.
401. Sutmoller P., Casas Olacoaga R. Unapparent foot and mouth disease infection (sub-clinical infections and carriers): Implications for control//Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). – 2002, Vol. 21, № 3. – P. 519-529.
402. Sutmoller P., Cottral G.E. Situación epidemilógica de la fiebre aftosa en Latinoamérica//3rd Congr. med. vet. and Zootechnica del Peru (Lima, 17-23 May 1970). – Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio-de Janeiro, May 1970. – P. 6.
403. Sutmoller P., Cottral G.E., McVicar J.W. A review of the carrier state in foot-and-mouth disease // Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc. – 1967, Vol. 71. – P. 386–395.
404. Sutmoller P., McVicar J.W., Cottral G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle// Arch. Gesamte. Virusforsch. – 1968, Vol. 23, №3. – P. 227-235.
405. Traub E., Mohlmann H. Untersuchungen iiber immunologische varianten der Typen A und B des MKS-virus//Berl.und Miinch.tieraztl.Wschr. – 1949, Vol. 1. – P. 1-5.
406. Trautwein K. Die Pluralität des Maul und Klauenseuche Virus//Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk., 1927, Vol. 56, №6. – P. 505.
407. Trautwein K., Reppin K. Weitere versuche tiber die Pluralität des MKS//Arch. Tierz. – 1930, Vol. 62. – P. 463-482.
408. Vajda B.P. Concentration and purification of viruses and bacteriophages with polyethylene glycol//Folia Microbiol (Praha). – 1978, Vol. 23, №1. – P. 88-96.

409. Valarcher J.F., Knowles N.J., Ferris N.P., Paton D.J., Zakharov V., Sherbakov A., Shang Y.J., Liu Z.X., Liu X., Sanyal A., Hemadri D., Tosh C., Rasool T.J. Recent spread of FMD virus serotype Asia 1//Vet. Rec. – 2005, vol. 157, №1. – P. 30.
410. Vallat B. FMD: the OIE accepts the challenge//BOIE. – 2002, №3. – P. 183-184.
411. Vallée H. Sur la pluralité des virus aphteux//BOIE. – 1982, Vol. 1. – P. 500.
412. Vallée H., Carre H. Hemoprovention et hemivaccination antiaphtouses //C. R. Acad.Sci. – Paris, 1921, Vol. 172. – P. 1449.
413. Vallée H., Carre H. Sur la pluralité du virus aphteux//C. R. Acad. Sci. – Paris, 1922, Vol. 174, №23. – P. 1498-1500.
414. Van Rensburg H., Haydon D., Joubert F., Bastos A., Heath L., Nel L. Genetic heterogeneity in the foot-and-mouth disease virus Leader and 3C proteinases//Gene. – 2002, Vol. 289. – P. 19-29.
415. Vigario J.D., Terrinha A.M., Moura Nunes J.F. Antigenic relationships among strain of African swine fever//Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung. – 1974, Vol. 45. – P. 272-277.
416. Vinuela E. African swine fever virus//Current Topics in Microbiology and Immunology.– 1985, №116. – P. 151-170.
417. Vlasova N.N., Kazakova A.S., Varentsova A.A., Akopian T.A., Kostryukova E.S. Comparative sequence analysis of genes encoding outer proteins of African swine fever virus isolates from different regions of Russian Federation and Armenia//International Journal of Virology and Molecular Biology. – 2012, №1. – P. 1-11.
418. Wadsworth J., Knowles N., Swabey K.G. Recent spread of new strains of foot-and-mouth disease virus type A in Middle East and North Africa // International Control of FMD: Tools, Trends and Perspectives: Open Sess. Res. Group Stand. Techn. Comm. Europ. Commiss. Control FMD. – Paphos, Cyprus, 2006. – P. 14.
419. Waldmann O., Trautwein K., Experimentelle Untersuchungen über die Pluralität des Maul- und Klauenseuchevirus. Berl. Tierärztl. Wschr. – 1926, Vol. 42. – P. 569-571.
420. Wardley R.C., Abu Elzein E.M., Crowther J.R., Wilkinson P.J. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever virus antigen and antibody//Journal of Hygiene. – 1979, №83. – P. 363-369.

421. Whyard T.C., Wool S.H., Letchworth G.J. Monoclonal antibodies against African swine fever viral antigens//Virology. – 1985, №142. – P. 416-420.
422. Wilkinson P.J. African swine fever virus. – In book “Virus infections of porcines” edited by M.C.Penjaert, 1989. – P. 17-32.
423. Wilkinson P.J. Epidemiology of African swine fever//OIE Revue Scientifique et Technique. l’Office International des Epizootics. – 1986, № 5 (2). – P. 487-493.
424. Wilkinson P.J., Donaldson A.I., Greig A., Bruce W. Transmission studies with African swine fever virus. Infection of pigs by airborne virus//Journal of Comparative Pathology. – 1977, №87. – P. 487-495.
425. WWW. http://bono-esse.ru/blizzard/Medstat/Statan/stat_dri.html
426. XVII Conference of the OIE Food and Mouth disease Commission working document. – Paris, 1986. – P. 47-60.

П Р И Л О Ж Е Н И Е

ИССЛЕДОВАНИЯ В ШИРАКСКОМ МАРЗЕ, 1998-2002

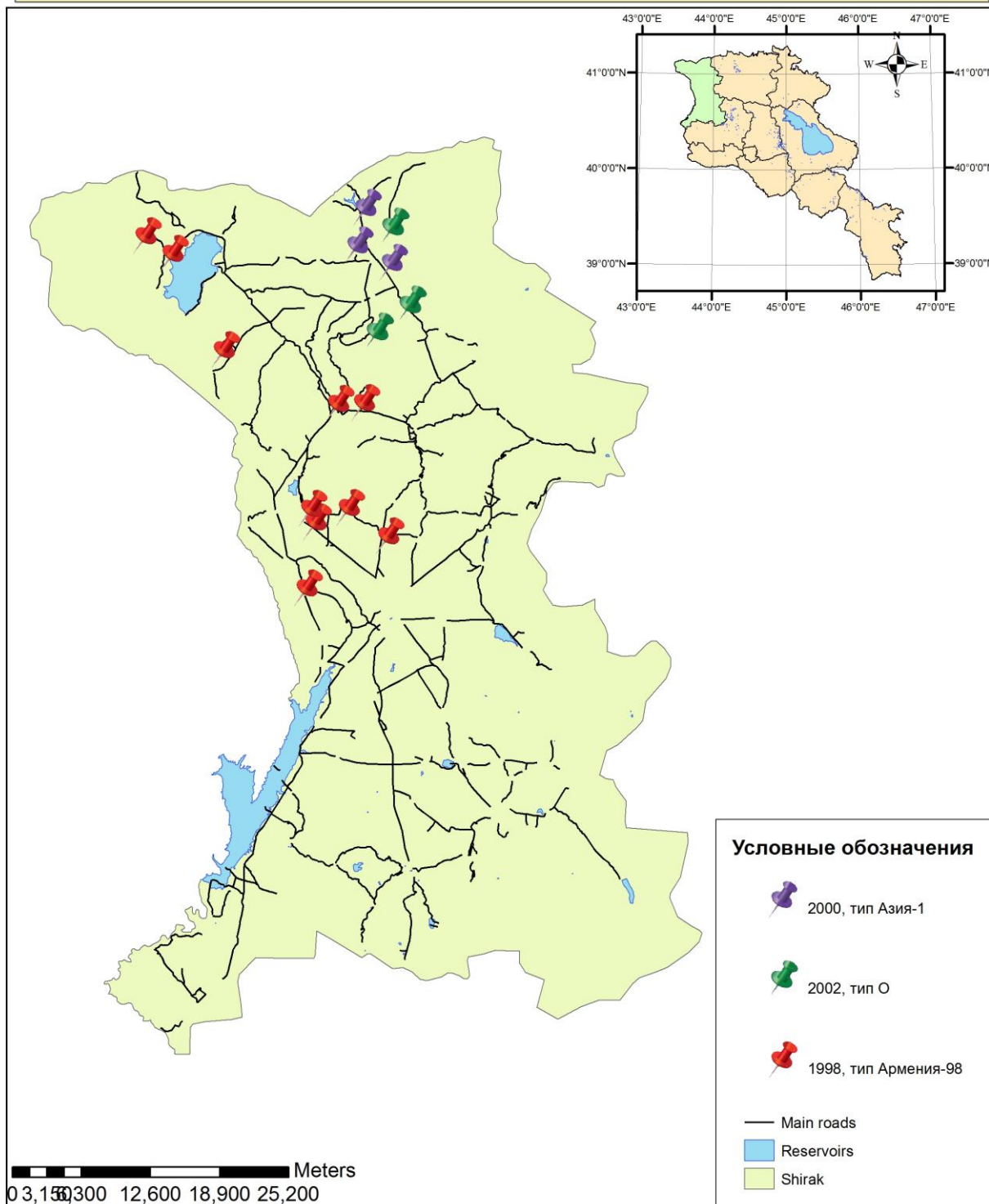


Рис. 2

**ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЯЩУРУ
В АРМЕНИИ И НАГОРНО-КАРАБАХСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ,
1998-2008 ГГ.**

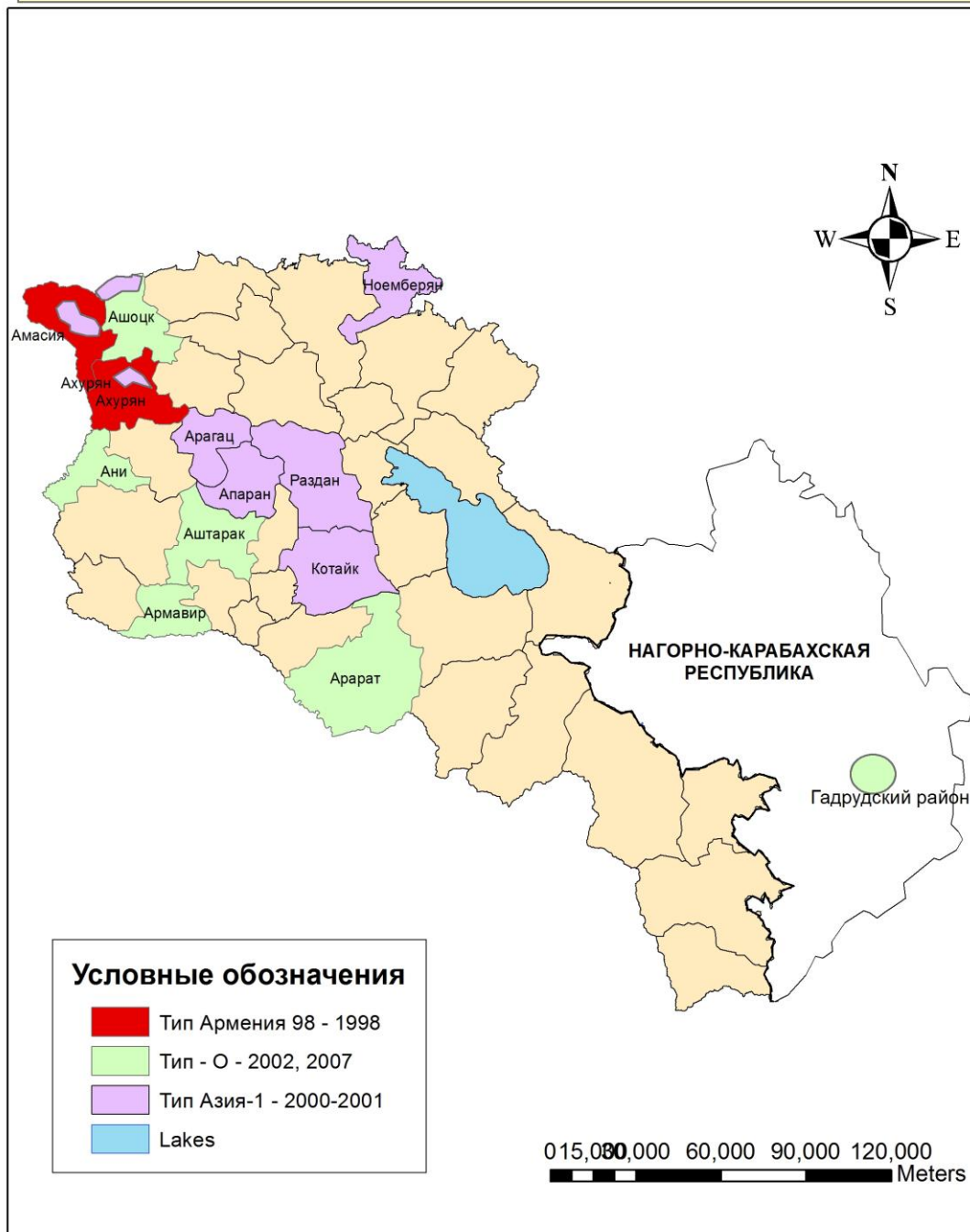


Рис. 3

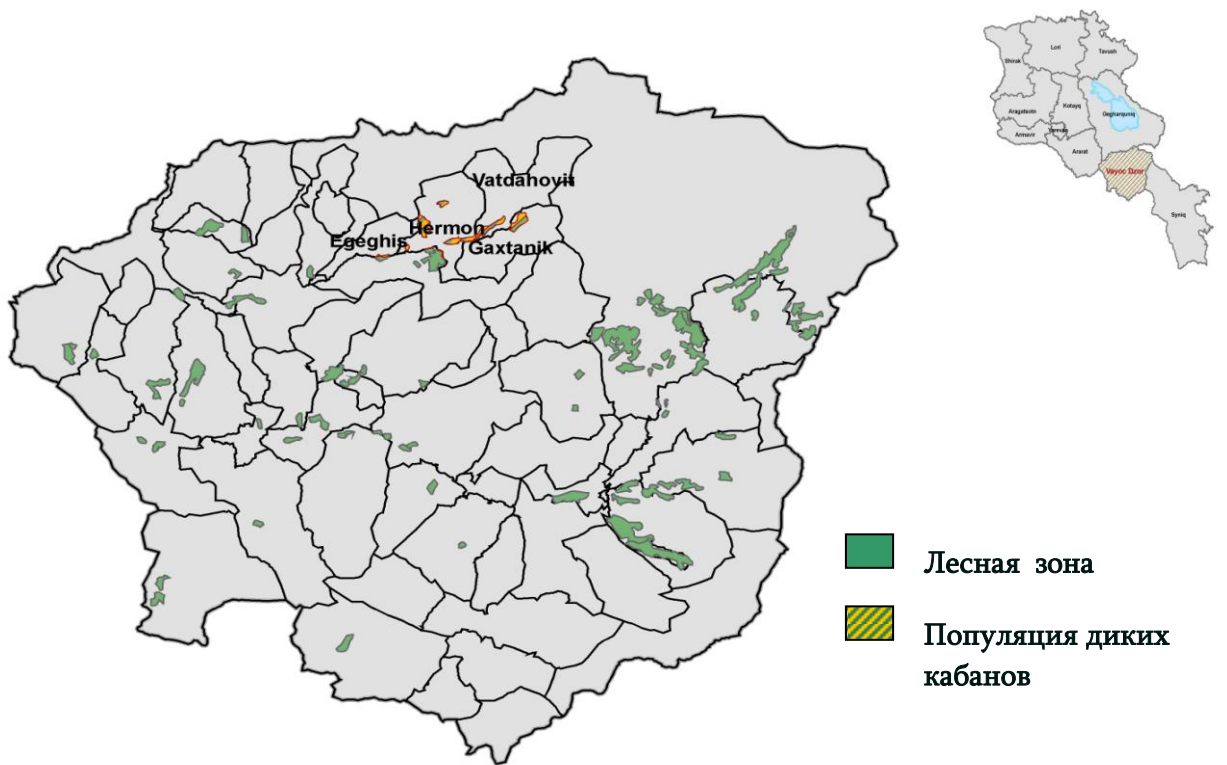


Рис.7 Распространенность диких кабанов на территории Вайоц Дзорского марза

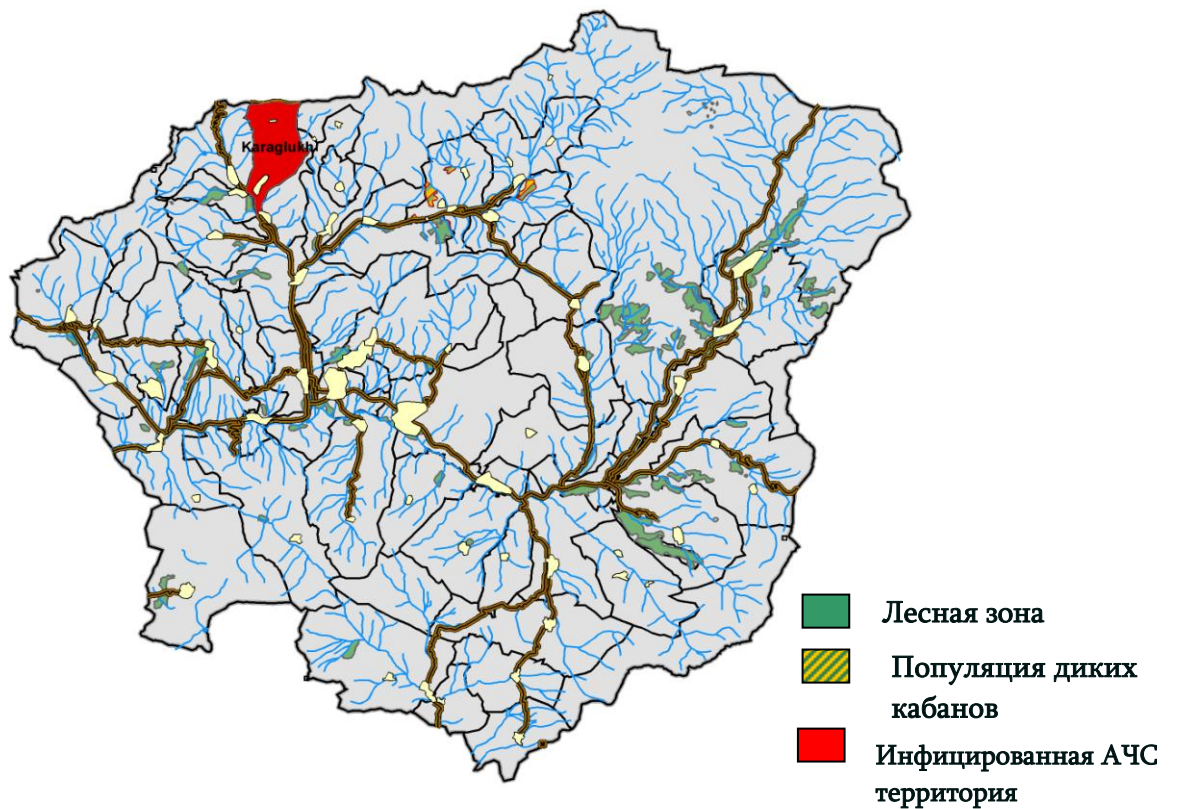


Рис.8. Инфицированные АЧС территории Вайоц Дзорского марза и места контактирования домашних и диких свиней

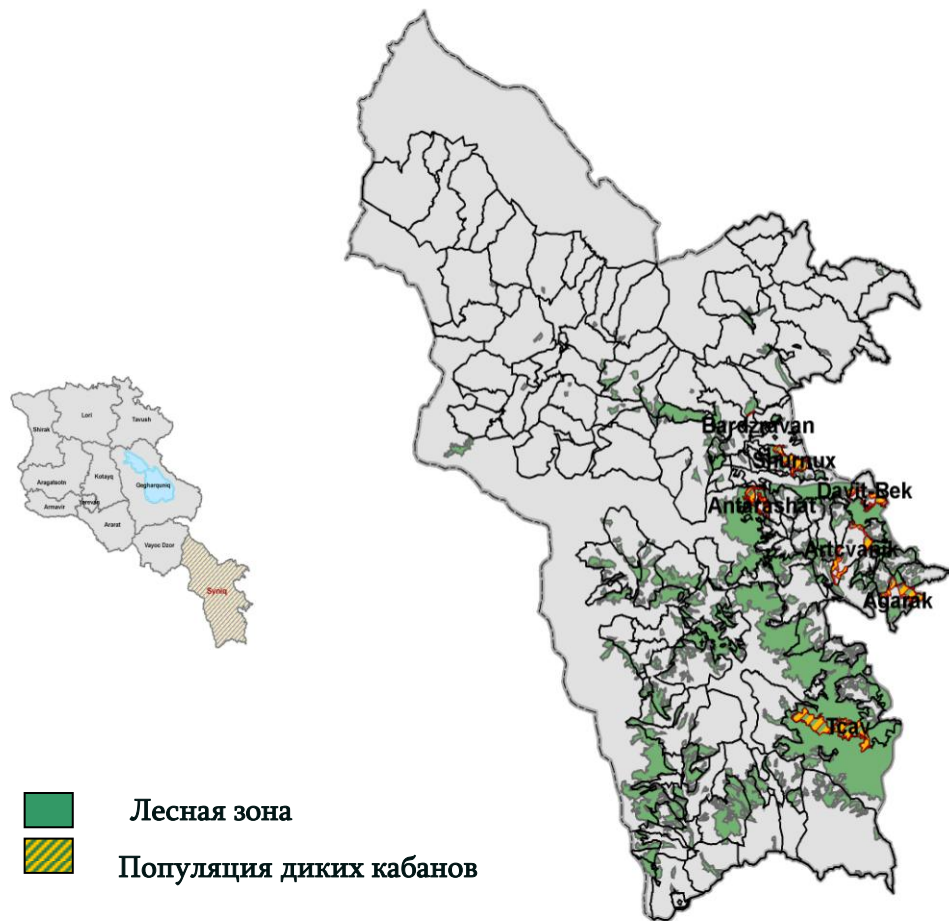


Рис.9. Распространенность диких кабанов на территории Сюникского марза

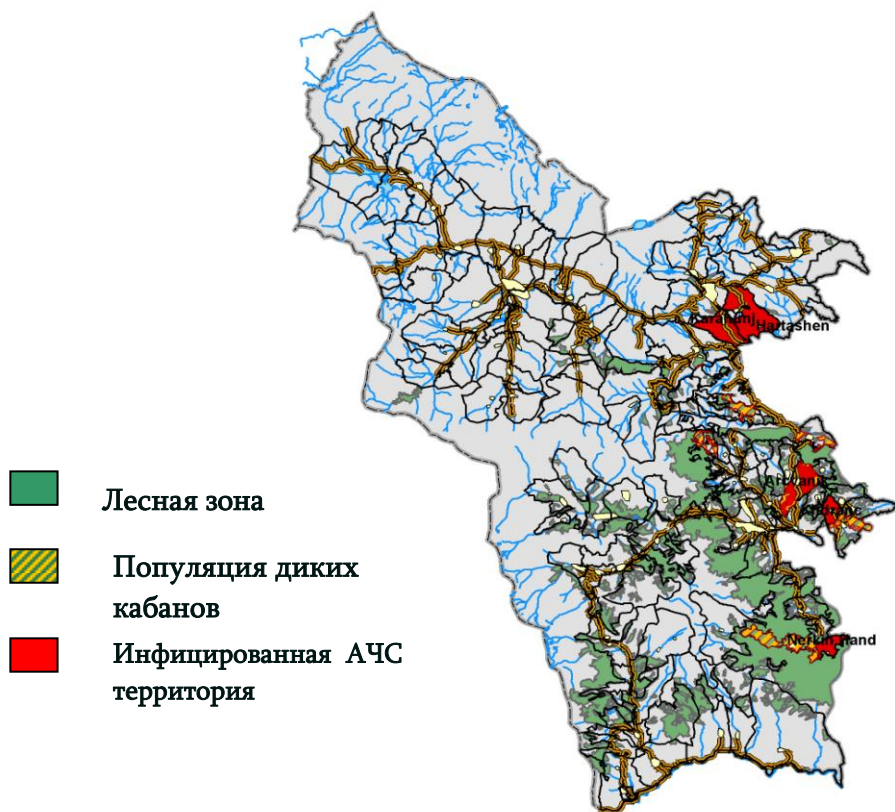


Рис.10. Инфицированные АЧС территории Сюникского марза и места контактирования домашних и диких свиней

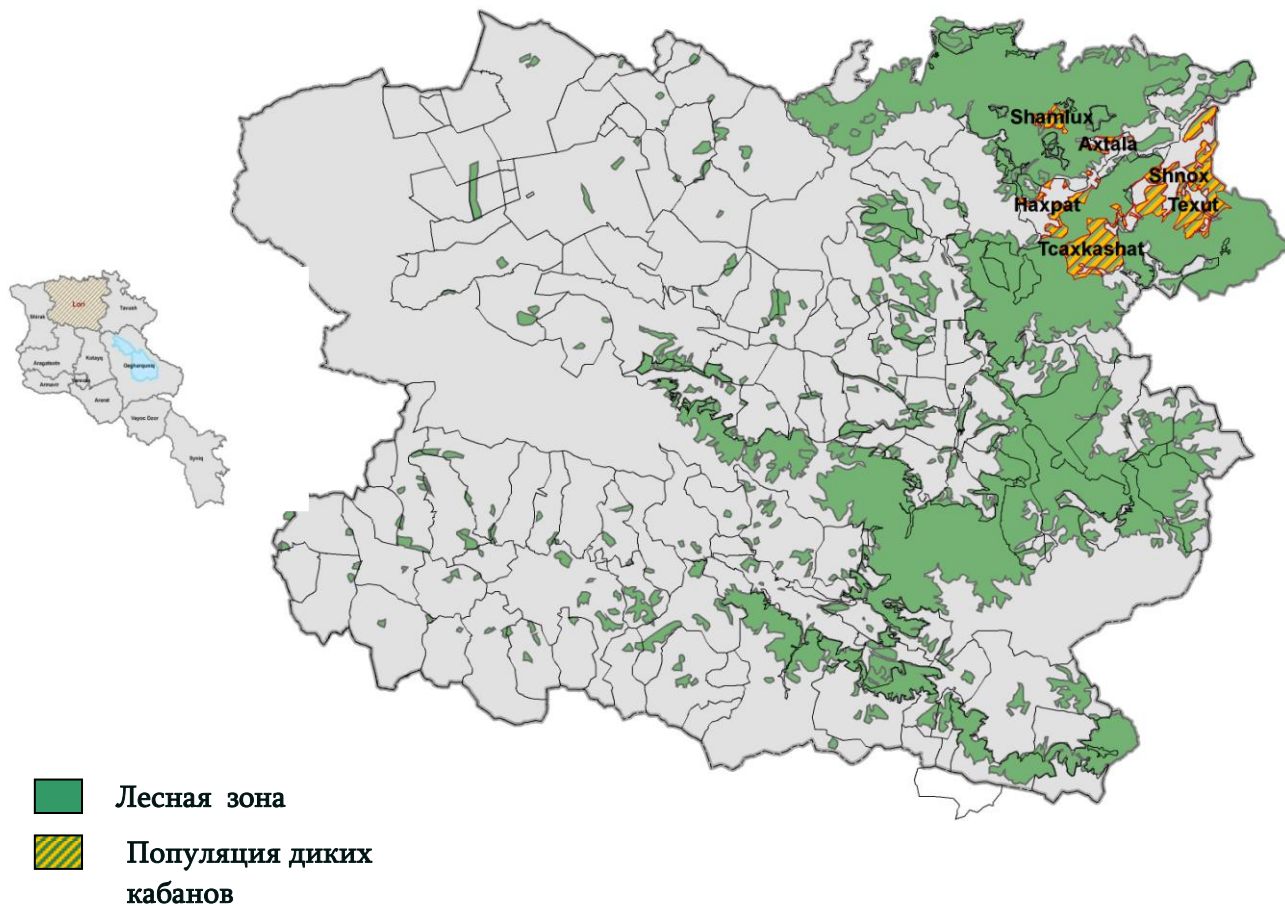


Рис.11 Распространенность диких кабанов на территории Лорийского марза

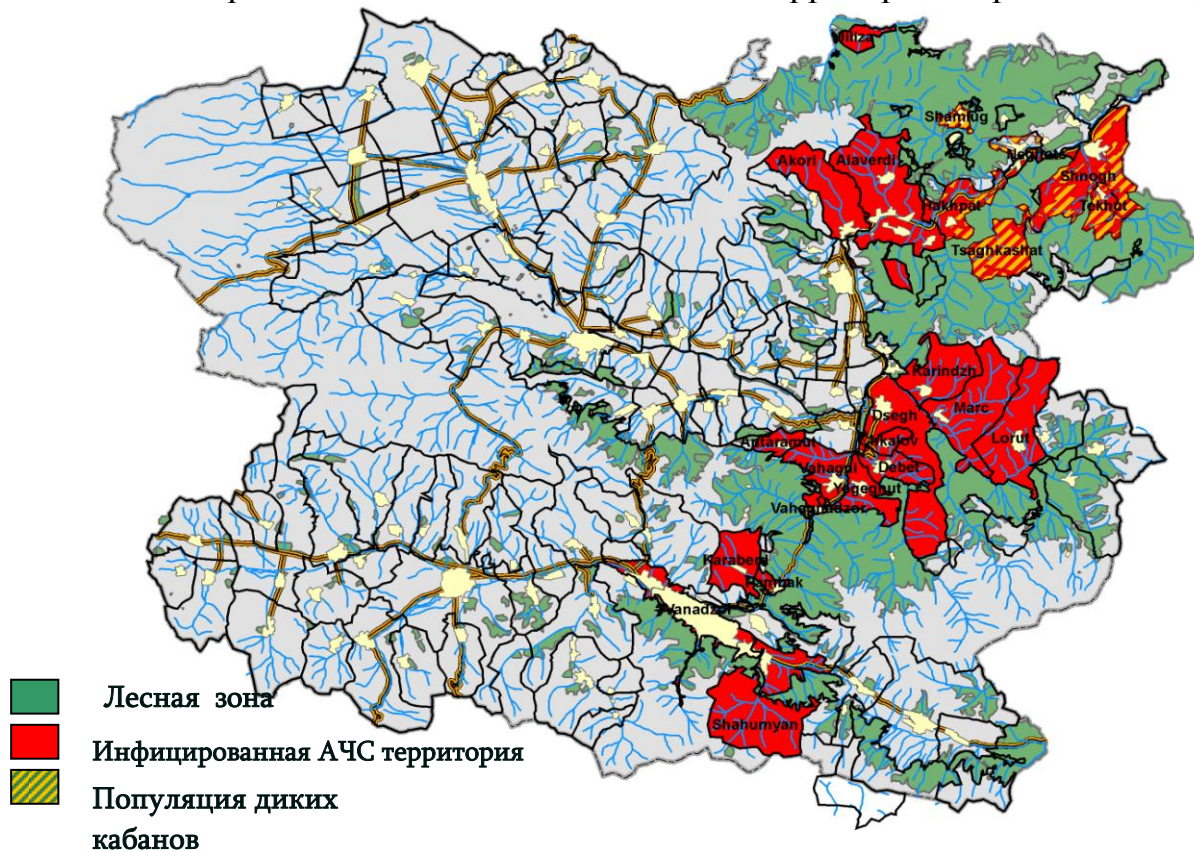


Рис.12. Инфицированные АЧС территории Лорийского марза и места контактирования домашних и диких свиней

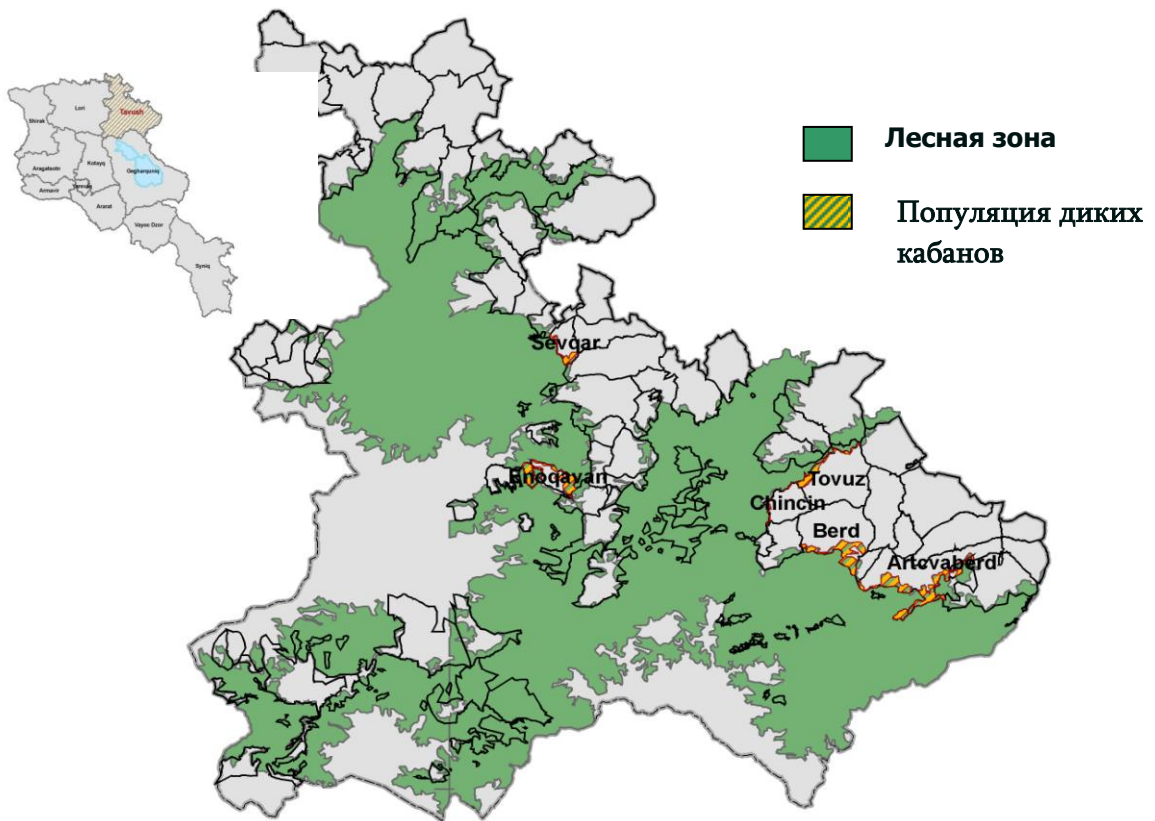


Рис.13. Распространенность диких кабанов на территории Тавушского марза

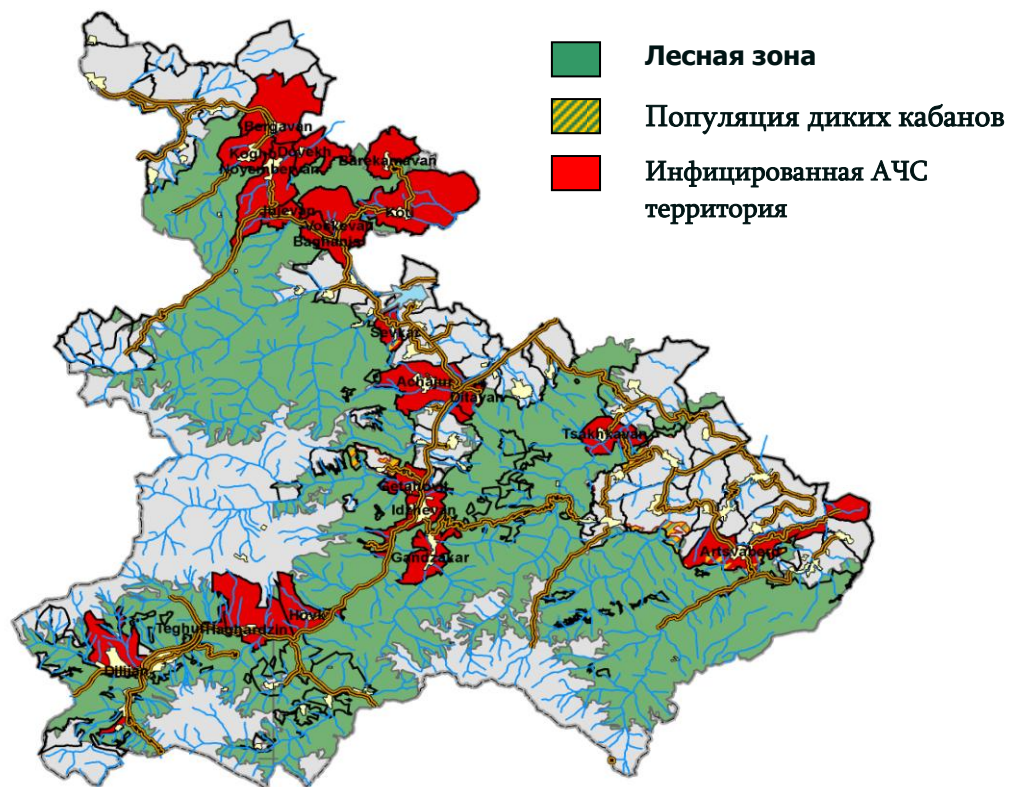
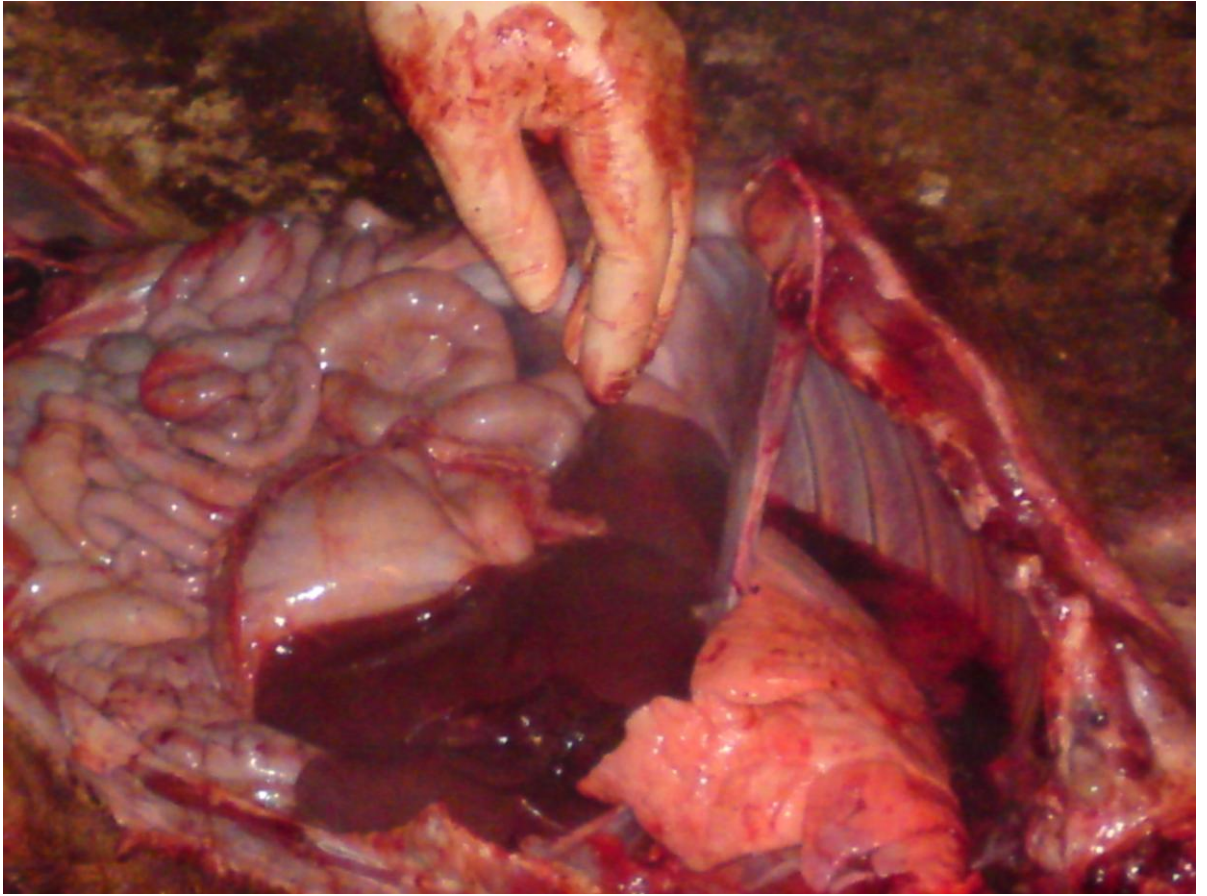


Рис.14. Инфицированные АЧС территории Тавушского марза и места контактирования домашних и диких свиней



Φωτο 1



Φωτο 2



Фото 3



Фото 4



Фото 5

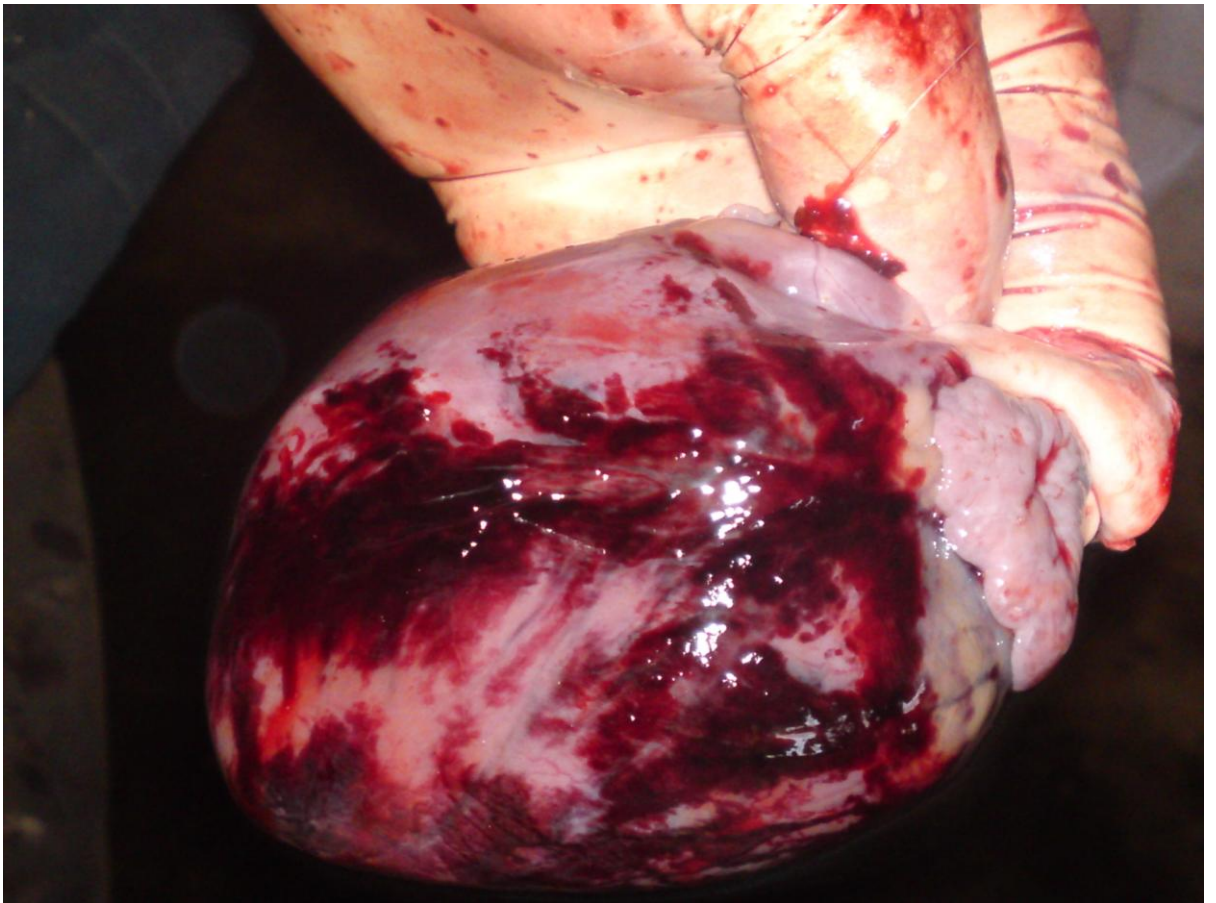


Фото 6



Фото 7



Фото 8-11