**Министерство образования и науки Кыргызской Республики**

**Кыргызский национальный аграрный университет**

**имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д.06.14.489

На правах рукописи

**УДК 619:616.962-08+619:616.9-07]619:616.959(574)**

**Абишов Абдикалык Абдижаппарович**

**ПРОФИЛАКТИКА И ДИАГНОСТИКА**

**ЯЩУРА ПАРНОКОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук

**Бишкек – 2015**

**Диссертационная работа выполнена в ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан**

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, член корр. НАН КР, профессор

**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович**

доктор ветеринарных наук, профессор

**Абуталип Аспен Абуталипович**

доктор ветеринарных наук

**Кыдырманов Айдын Исагалиевич**

**Ведущая организация:** Казахский агротехнический университет

им. Сакена Сейфуллина, г. Астана, пр. Победы

Защита диссертации состоится «\_\_\_» февраля 2016 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.06.14.489 при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

Автореферат разослан «\_\_\_\_» января 2016 г.

****

**Ученый секретарь**

**диссертационного совета,**

**кандидат ветеринарных наук Крутская Е.Д.**

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы диссертации.** Основной задачей ветеринарной науки и практики является создание устойчивого благополучия страны по особо опасным инфекционным болезням животных.

Одним из инфекционных заболеваний парнокопытных, продолжающим наносить серьезный экономический ущерб животноводческой отрасли многих стран, является ящур, который регистрировался в 2015 году в странах Азии и Африки [www.fao.org/ag/againfo/commissions/eufmd].

В арсенале ветеринарных служб многих стран имеются ветеринарные препараты, предназначенные для специфической профилактики ящура. Широкое применение специфических препаратов требует особого контроля их качества, которое определяется технологическими процессами, изготовления и применения на практике. Конструирование противоящурной вакцины из различных серовариантных штаммов является сложной задачей и подразумевает получение специфического профилактического препарата, обладающего высокими иммунобиологическими свойствами против каждого типа ящура [Бурдов А.Н.;1990; Мищенко А.В., 2011; Яременко Н.А., 1976; Гуленкин В.М., 2010].

Международный опыт борьбы с ящуром свидетельствует о том, что для специфической профилактики данного заболевания широко применяются моно- и поливалентные вакцины из инактивированного вируса, культивируемого в различных биологических системах, в зависимости от эпизоотической актуальности штаммов и типов [Васько Е.В. и др., 1970; Равилов А.З. и др., 1982; Barteling S.J., 1982; Сокова В.В., 1987].

Иммуногенная активность противоящурных вакцин зависит от количества и качества вирусного агента, способа применения и технологии изготовления препарата, а также от используемого неспецифического стимулятора иммунитета – адъювантов [Еремец В.И., 1999; Жильцова М.В., 2008; Кулагина А.Г. и др., 2010].

Выпускаемые в настоящее время в Российской Федерации вакцины изготавливаются в виде адсорбированных препаратов, в которых в качестве адъювантов используется гель гидрата окиси алюминия, бентонит, фосфат кальция и сапонин. Однако этот тип вакцин имеют свои преимущества и существенные недостатки. К недостаткам можно отнести слабую иммуногенность, т.е. индуцирует недостаточно напряженный и непродолжительный иммунитет. Вакцина используется для профилактики ящура только среди мелкого и крупного рогатого скота, а у свиней не стимулирует образование специфического иммунитета [Овчаренко И.В., 1970; Bauer K. et. al., 1973; Мамков Н.С., 1999; Тимитей А., 2009].

В то же время известно, что эмульсионные вакцины, приготовленные на основе высококачественных минеральных масел и эмульгаторов, успешно применяются для профилактики ящура КРС в ряде стран Южной Америки [Kanarek A.D., 1967].

В Казахстане для специфической профилактики ящура применяют различные адсорбированные вакцины для иммунизации мелкого и крупного рогатого скота и эмульгированные инактивированные вакцины, полученные в суспензии перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13.

Технология изготовления вакцин разработана научно-исследовательскими учреждениями Российской Федерации, вакцины производятся и поставляются в Казахстан ФГУ «Щелковский Биокомбинат» и ФГУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных». Профилактические препараты создают иммунитет спустя 2-3 недели после вакцинации, содержат в прививном объеме в пределах 3 (ИмД50) пятидесятипроцентных иммунизирующих доз, обеспечивающих защиту животных от ящура на 6 месяцев.

Важнейшим условием противоэпизоотической эффективности противоящурных вакцин является соответствие антигенных свойств производственного штамма вируса ящура эпизоотическим штаммом. В случае антигенного отличия эпизоотических штаммов возникает необходимость получения нового производственного штамма вируса. К сожалению таких вирусологических исследований, с возбудителем ящура учеными Казахстана не проводилось. В этой связи для целенаправленной борьбы с ящуром конкретных типов вируса, циркулирующих на территории Казахстана, существует объективная необходимость во всестороннем изучении наиболее распространенных штаммов вируса ящура типа А, О, Азия-1 и разработке специфического средства профилактики. Другим не менее актуальным направлением исследовательских работ является оптимизация биотехнологии получения универсальной поливалентной вакцины, пригодной для иммунизации всех видов парнокопытных животных от ящурной инфекции.

**Связь темы диссертации с планами НИР ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт».** Работа выполненав соответсвии следующих научных программ:

1. 042 «Прикладные научные исследования в области агропромышленного комплекса по теме: «Разработка средств диагностики и профилактики вирусных болезней животных» (№Госрегистр. 0106РК00757, 2005-2007гг.);

2. 0.0502(28) «Оценка рисков распространения, диагностика и профилактика инфекционных и инвазионных болезней животных и птиц» в соответсвии с бюджетной программой 042 «Прикладные научные исследования в области агропромышленного комплекса по теме: «Разработка технологии изготовления культуральной трехвалентной вакцины против ящура типов А, О и Азия-1 и средств диагностики инфекционной анемии и лейкоза крупногог рогатого скота» (№ госрегистр.0109РК01035, 2008-2011 гг.);

3. 055 Научная и/или научно-техническая деятельность, подпрограмма 101 Грантовое финансирование научных исследований МОН РК по теме: «Технология изготовления профилактического препарата против ящура сельскохозяйственных животных» (№ госрегистр.0012РК02123, 2012-2014 гг.).

**Цели и задачи исследования.** Целью научных исследований явилось изучение иммунобиологических свойств полевых штаммов вируса ящура, выделенных на территории Республики Казахстан и разработка на их основе диагностических и профилактических препаратов против ящура.

Для достижения вышеуказанной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

* выделить полевые штаммы возбудителя ящура серотипов А, О и Азия-1 и изучить их иммунобиологические свойства;
* изучить культуральные свойства полевых штаммов возбудителя ящура серотипов А, О и Азия-1 и разработать технологию их культивирования на чувствительной биологической системе;
* разработать технологию изготовления типоспецифических антигенов вируса ящура серотипов А, О и Азия-1 для серологических реакций;
* разработать технологию изготовления типоспецифических сывороток против вируса ящура к серотипам А, О и Азия-1, используемых для индикации и идентификации полевых изолятов возбудителя;
* разработать технологию изготовления трехвалентной инактивированной культуральной эмульгированной вакцины против ящура парнокопытных животных; изучить ее иммунобиологические свойства.

**Научная новизна работы**

Получен штамм возбудителя ящура типа Азия-1, который выделен от больного крупного рогатого скота во время эпизоотии в Алматинской области Республики Казахстан.

Изучены иммунобиологические свойства полевого штамма типа Азия-1 возбудителя ящура парнокопытных, выделенного на территории Республики Казахстан.

Разработана технология изготовления антигенов возбудителя ящура типов А, Азия-1 и О.

Разработана технология изготовления типоспецифических сывороток против возбудителя ящура типа А, Азия-1 и О.

Разработана технология изготовления трехвалентной культуральной инактивированной универсальной вакцины против ящура типов А, О и Азия-1.

**Практическая значимость полученных результатов**

Результаты проведенных научно-исследовательских работ отражены в 7 нормативно-технических документах по изготовлению, контролю и применению диагностических и профилактических препаратов. Подобраны иммуностимулирующие монтаниды марок ISA-50, ISA-70, ISA-3012, ISA-206 в составе инактивированных моно- и трехвалентных вакцин, которые обеспечивают стабильность и сохранность исходных иммунобиологических свойств эмульсионной вакцины против ящура при различных температурах хранения, обладают низкой реактогенностью, вязкостью и температурой застывания. Инактивированные вакцины, изготовленные с использованием адъювантов ISA-50, ISA-70, ISA-70, ISA-3012, ISA-206 рекомендуются для профилактики ящура среди крупного и мелкого рогатого скота, а также среди свиней.

Для ретроспективной диагностики ящура парнокопытных животных разработана технология изготовления типоспецифических антигенов и штаммоспецифических сывороток с использованием полевых штаммов вируса типов А, О и Азия-1.

Для ветеринарной практики разработаны следующие нормативно-технические документы:

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена О вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена Азия-1 вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу О вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

- комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях.

**Экономическая значимость полученных результатов.** Изготовленные типоспецифические антигены, сыворотки после их испытаний будут рекомендованы к использованию с профилактической, диагностической целью. Разработанная трехвалентная инактивированная вакцина, сыворотки и антигены могут быть использованы в качестве коммерческих конкурентоспособных препаратов для диагностики, профилактики ящура на территории Республики Казахстан и приграничных республики. При условии отечественного производства данных препаратов отпадет необходимость в импорте зарубежных дорогостоящих препаратов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

* иммунобиологические свойства лабораторных и полевых штаммов возбудителя ящура типов А, О и Азия-1, выделенные на территории Республики Казахстан;
* технология изготовления антигена вируса ящура типов А, О и Азия-1 для серологических реакций;
* технология получения типоспецифических сывороток против вируса ящура к серотипам А, О и Азия-1;
* иммунобиологические свойства поливалентной вакцины инактивированной культуральной против ящура парнокопытных животных.

**Публикация научных исследований.** По материалам диссертации опубликовано 38 научных работ. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на научных конференциях по актуальным проблемам ветеринарии.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 258 листах компьютерного текста, включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты исследований, выводы и практические предложения. Список использованной литературы включает 553 источников. Диссертация иллюстрирована 56 таблицами и 8 рисунками.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность темы исследований, необходимость в разработке отечественной противоящурной вакцины против наиболее распространенных типов вируса А, О, Азия-1, и получения производственных штаммов вируса, репродуцирующего в культурах клеток.

**В главе 1 «Обзор литературы»** по материалам отечественных и зарубежных публикаций описана история создания средств профилактики ящура, дана характеристика созданных и применяемых противоящурных вакцин.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** приведены использованные методики работ.

Обнаружение и определение типовой принадлежности вируса ящура проводили в РСК по 100%-ному гемолизу эритроцитов. Для постановки реакции использовали наборы антигенов из типовых штаммов вируса ящура, гипериммунные сыворотки, комплемент, гемолитическую сыворотку и эритроциты барана.

Материалом для исследования на наличие вируса ящура служили стенки и содержимое афт, полученные от естественно или экспериментально инфицированных животных, тушки больных мышат-сосунков и крольчат. Серологические реакции ставили согласно методических указаний по их постановке.

Для приготовления ящурного антигена типов А, О и Азия-1 и трехвалентной вакцины афтозный вирус адаптировали к организму 1-2 суточных крольчат. Из патологического материала от заболевших и экспериментально инфицированных животных по отдельности готовили вируссодержащий материал для заражения морских свинок, крольчат, мышат-сосунов, взрослых мышей, культур клеток и изучения их чувствительности к возбудителю ящура и иммунобиологических свойств полевых штаммов.

После каждого пассажного уровня вируса ящура из тушек крольчат, забитых в момент развития клинических признаков инфекции, готовили 10%-ную, а для специфического антигена 33%-ную суспензию, в которых устанавливали уровень накопления комплементсвязывающего, преципитирующего и вируснейтрализующего антигенов.

Инактиванты.В опытах в качестве инактивантов использовали формальдегид и димер этиленимина в различных концентрациях, исследования проводили в различных температурно-временных условиях 4, 27 и 37°С.

Авирулентность инактивированных препаратов лапинизированного и культурального вируса ящура определяли путем заражения мышат-сосунов и монослой культур клеток в течение трех последовательных пассажей. При каждом пассажном уровне пробы материалов проверяли в РСК на наличие или отсутствие вируса ящура.

В сравнительных экспериментах изучали иммуностимулирующие свойства монтанидов ISA-206, ISA-70, ISA-50, ISA-3012, а в качестве контрольного адъюванта использовали гель гидрата окиси алюминия.

Для получения типоспецифических сывороток против возбудителя ящура использовали взрослых кроликов весом более 3 кг и морских свинок. Опытные группы животных по отдельности подвергали иммунизации и гипериммунизации очищенной вирусной суспензией из вируса ящура типов Азия-1, А и О с использованием геля гидрата окиси алюминия с сапонином и различные марки монтанида.

Безвредность, реактогенность и иммуногенную активность экспериментальных серий вакцин проверяли на интактных морских свинках, белых мышатах, кроликах, КРС и свиньях.

Иммуногенность вакцины определяли количественно и качественно путем установления 50%-ной иммунизирующей дозы (ИмД50) на морских свинках. О степени напряженности иммунитета судили по результатам контрольного заражения привитых животных вирулентным вирусом и по титру комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител в сыворотке крови. Для контрольного заражения привитых животных использовали гомологичный инфекционный вирус в дозе 104 ИД50.

Титры комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител в индивидуальных сыворотках крови лабораторных и сельскохозяйственных животных определяли в РСК, РИД и РН согласно их наставлению по применению.

С целью изучения чувствительности, оптимальных условий культивирования и накопления полевых штаммов вируса ящура типов А, Азия-1 и О использовали перевиваемые линии клеток ВНК-21, ПТ-80, МДВК, СПЭВ, РК-15, ТТ, ПО и из первичных клеток ПС, ПЯ и ПТ. Инфицирование культур клеток проводили в дозах от 0,001 до 0,1 ТЦДкл. Биологическую активность вируссодержащей суспензии устанавливали методом титрования на соответствующей культуре клеток, с дублированием на линии клеток ВНК-21/13.

При проведении научно-исследовательских работ были использованы штаммы вирус ящура серотипов А, О и Азия-1, адаптированные к организму белых мышей, крольчат, морских свинок и культуре клеток.

Для приготовления антигенов вирусные суспензии каждого типа в отдельности смешивали в равных частях с защитной средой, содержащей 6% сахарозы, 8% пептона и 1% желатина, приготовленной на бидистиллированной воде, с рН 7,2-7,4. Стабилизированную вирусную суспензию разливали по 1 см3 в инсулиновые флаконы и подвергали сублимационному высушиванию в установках типа ТГ-50, Frigera LZ-45.

**РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**В главе «Результаты собственных исследований»** изложен последовательно процесс выделения и идентификации возбудителя ящура парнокопытных животных, адаптация его к организму разных восприимчивых видов животных. Приводятся результаты исследований по разработке технологических параметров культивирования полевых штаммов в различных культурах клеток, подбору инактивантов и изучения их действия на 146S частицы и иммуногенную активность лапинизированного вируса ящура. В последующих разделах диссертации излагается процесс разработки технологии изготовления специфических антигенов и получения штаммоспецифических сывороток к вирусу ящура типов А, О, Азия-1, изучение их активности в зависимости от срока хранения.

**Выделение и идентификация возбудителя ящура парнокопытных**

В период 2003-2004 гг. в южном регионе Казахстана часто регистрировались заболевания парнокопытных животных с синдромом ящура, что в большинстве случаев, при отсутствии комплексных лечебных мероприятий приводило к летальному исходу молодняка. Клинические признаки болезни характеризовались повышением температуры тела, развитием обильного слюнотечения, появлением эрозии на слизистой ротовой полости, в области венчика и межкопытной щели, быстрым исхуданием и ослаблением организма. Первоначальной задачей наших исследований являлось выделение от больных животных возбудителя, который являлся этиологическим агентом болезни, и идентификация возбудителя.

От нескольких заболевших животных с клиникой обильного слюнотечения, эрозии и язв области губ и слизистой ротовой и носовой полостей взят патологический материал (афты), из которого изготовлена 1% тканевая суспензия. Обработанным антибиотиками и отфильтрованным материалом инфицировали мышат-сосунков в дозе 0,2 см3. Через 18-20 часов после инъекции суспензии мышата-сосуны заболели, а после падежа из их тушек и тканей готовили 10% суспензию и использовали для заражения очередной группы мышат-сосунков. Таким образом, провели 3 последовательных пассажа исследуемого возбудителя на лабораторных животных. Полученные от них тканевые материалы подвергали серологическому исследованию в реакции связывания комплемента по 100%-ному гемолизу эритроцитов барана с использованием штаммоспецифических сывороток против возбудителя ящура типов А, О, С и Азия-1.

Результаты серологических исследований показали, что выделенный полевой изолят в цельном и в начальном разведениях активно взаимодействовал со всеми типоспецифическими сыворотками против ящура 1. Результаты серологических исследований свидетельствовали о том, что этиологическим началом для заболевания крупного и мелкого рогатого скота, свиней и коз в южном регионе Республики Казахстан являлся возбудитель ящура. В серологических реакциях он идентифицирован как полевой штамм типа Азия-1 данного особо опасного вируса ящура.

**Адаптация вируса ящура типов А, О и Азия-1 к организму лабораторных животных**

В экспериментах использовали эпизоотические штаммы трех серотипов возбудителя ящура для получения лабораторных вариантов штаммов, адаптированных к организму новорожденных крольчат и морских свинок, первичнотрипсинизированной и перевиваемой линии культур клеток. Разные варианты штаммов возбудителя в последующем использовались для изучения их иммунобиологических свойств и при разработке технологии изготовления антигенов, сорбированных и эмульгированных вакцин.

Из имеющихся в лаборатории эпизоотических афтозных вирусов ящура серотипов А, О и Азия-1 по отдельности была приготовлена 1%-ная афтозная суспензия возбудителя.

Афтозным вирусом каждого серотипа инфицировали новорожденных мышат-сосунов в объеме 0,1 мл в область спины. Для каждого пассажа использовали по 10 пометов белых мышат, для наработки достаточного количества серотипных материалов. Через 24-26 часов после инфицирования животных забивали в стерильном боксе и из их тушек готовили 10%-ный тканевую суспензию на фосфатно-буферном растворе с рН 7,4-7,6. Замораживание вирусных тканевых суспензий проводили при температуре минус 20ºС в течение 24-36 часов и размораживали при температуре 20 ºС. Биологический материал серотипов очищали от балластных белков методом центрифугирования и обработкой 5% хлороформом в конечной концентрации. Всего в организме мышат проведено по 5 последовательных пассажей. Активность тканевых вирусных антигенов трех серотипов представлена в таблицах 1, 2 и 3.

**Таблица 1 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа А в организме мышат-сосунков**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № пп | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа А | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирую-щий антиген | биологическая активность полевого штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 6,08+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 7,83+0,166 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 8,16+0,08 |

**Таблица 2 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа Азия-1 в организме мышат-сосунков**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа Азия-1 | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирую-щий антиген | биологическая активность полевого штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 6,08+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 7,83+0,166 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 8,00+0,00 |

**Таблица 3 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа О в организме мышат-сосунков**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа О | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирую-щий антиген | биологическая активность поле-вого штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,08+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,91+0,083 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 7,33+0,166 |

Уровень накопления антигенов во всех 3-х вариантах реакции был идентичным.

**Адаптация возбудителя к организму крольчат.** Адаптацию трех серотипов возбудителя проводили с целью получения лапинизированных штаммов и изготовления антигенов, используемых при гипериммунизации животных и ретроспективной диагностике. Критерием оценки адаптированности вируса к организму животных являлась начало проявления характерных клинических симптомов болезни, время гибели и уровень накопления комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антигенов. На каждый пассажный уровень возбудителя использовали по 10 крольчат. После проведения каждого пассажного уровня вируса изучали динамику накопления комплементсвязывающего и преципитирующего антигенов трех типов в соответствующих серологических реакциях.

Также определяли динамику инфекционности возбудителя по отношению первичной культуры клеток. Вирус в эксперименте для титрования использовали без адаптации после каждого пассажа в организме крольчат. Из мышечной ткани павших от ящура крольчат готовили 10% суспензию, после удаления балластных белков и обработки биологической массы антибиотиками суспензию использовали для титрования в культуре клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 4, 5 и 6.

**Таблица 4 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа А в организме крольчат**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящуратипа А | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирующий антиген | биологическая активность полевого штамма на пер-вичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,08+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:3,33+0,66 | 6,08+0,166 |
| 6 | VI | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,33+0,166 |
| 7 | VII | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 8 | VIII | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,58+0,166 |
| 9 | IX | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 6,66+0,08 |
| 10 | X | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 6,83+0,166 |
| 11 | XI | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 6,83+0,166 |
| 12 | XII | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 6,91+0,083 |
| 13 | XIII | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,08+0,166 |
| 14 | XIV | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,25+0,00 |
| 15 | XV | 1:106,66+21,33 | 1:13,33+2,66 | 7,83+0,166 |
| 16 | XVI | 1:106,66+21,33 | 1:13,33+2,66 | 8,00+0,00 |

Результаты, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что в начальной стадии адаптации штамма титр комплементсвязывающего антигена составлял от 1:1,33+0,66 до 1:3,33+0,66. С увеличением пассажного уровня титр антигена возрастал и после 6-10 пассажей стабилизовался в пределах 1:26,66+5,33. Клинические симптомы ящура и падеж инфицированных животных стабильно наблюдали в период от 18 до 20 часов после заражения животных.

Начиная с 11 пассажа комплементсвязывающая активность вируса повысилась на один порядок, до 1:53,33+10,66, но начало проявления характерных для ящура, симптомы отмечали на 2-3 часа позднее, чем первых 10 пассажей. При дальнейшем пассировании полевого изолята вируса ящура фиксировали рост комплементсвязывающего титра до 1:106,66+21,33, время проявления клинических симптомов возросло до 19-20 часов, время падежа зараженных вирусом ящура типа А через 24-26 часов после инъекции им эпизоотического вируса.

В начальной стадии адаптации полевого изолята к организму восприимчивых животных титр накопление преципитирующего антигена вируса был на уровне 1:1,33+0,66. Рост титра преципитирующего антигена отмечен после 4-го пассажного уровня и на 5 пассаже титр составил 1:6,66+1,33. Дальнейшее культивирование полевого штамма возбудителя в организме лабораторных животных показало, начиная с 8 пассажного уровня динамика накопления преципитирующего антигена стабилизировалась в титре 1:13,33+2,66.

В процессе адаптирования полевого изолята вируса ящура к организму животных параллельно изучали биологическую активность каждого пассажного материала на первичнотрипсинизированной культуре клеток почки телят. При этом устанавливали начало проявления цитопатического эффекта в монослое и динамику разрушения клеточного пласта. Результаты титрования полевого штамма вируса ящура на культуре клеток почки теленка, представленные в таблице 5, свидетельствуют о том, что с первого пассажа инфекционная активность вируса полевого штамма типа А был достаточно высоким 6,08+0,166 lg ТЦД50/см3. С возрастанием пассажа параллельно прогрессировала инфекционная активность возбудителя в отношении крольчат и первичной культуры клеток. В начальной стадии адаптации вируса время проявления цитопатогенного изменения в монослое составило 26-28 часов после инфицирования в низких разведениях, и 72-96 часов в более высоких степенях разведения. Приблизительно к 7 пассажу биологическая активность вируса достигла среднеарифметического значения 6,33+0,166 lg ТЦД50/см3. Начало проявления цитопатогенного действия можно было наблюдать через 21-23 часов после заражения культур клеток, а поражение 80-90% клеток монослоя через 32-34 часа после инфицирования. С увеличением пассажного уровня полевого штамма время проявления цитопатогенных изменений и интенсивность поражения монослоя с каждым пассажом прогрессировал и на рубеже 16 пассажа биологическая активность установлена на уровне 8,00+0,00 lg ТЦД50/см3.

**Таблица 5 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа О в организме крольчат**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа О | | |
| комплементсвя-зывающий антиген | преципитирую-щий антиген | биологическая активность полевого штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | Цельное | 4,50+0,00 |
| 2 | II | 1:1,33+0,66 | Цельное | 4,58+0,166 |

Продолжение таблицы 5

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 3 | III | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 4,83+0,166 |
| 4 | IV | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,33+0,166 |
| 5 | V | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 6 | VI | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 7 | VII | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 8 | VIII | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 9 | IX | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 10 | X | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,58+0,166 |
| 11 | XI | 1:13,33+2,66 | 1:3,33+0,66 | 6,83+0,166 |
| 12 | XII | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,83+0,166 |
| 13 | XIII | 1:26,66+5,33 | 1:6,66+1,33 | 6,91+0,083 |
| 14 | XIV | 1:26,66+5,33 | 1:6,66+1,33 | 7,08+0,166 |
| 15 | XV | 1:53,33+10,66 | 1:6,66+1,33 | 7,08+0,166 |
| 16 | XVI | 1:53,33+10,66 | 1:6,66+1,33 | 7,25+0,00 |

Данные таблицы 5 свидетельствуют о том, что полевой изолят серотипа О активно репродуцировался в организме новорожденных крольчат. Всего проведено по 16 последовательных пассажей. При этом полевой штамм серотипа О вызывал характерные клинические признаки ящура, которые развивались спустя 20-24 ч после инфицирования животных, а падеж зафиксирован спустя 28-32 часов после введения им вирулентного штамма. В начальных стадиях, т.е. от 1 по 7 пассаж комплементсвязывающая активность антигена отмечена в пределах от 1:1,33+0,66 до 1:6,66+1,33, динамично прогрессируя с каждым пассажем. Начиная с 10 пассажного уровня репродукции титр комплементсвязывающего антигена составил от 1:6,66+1,33 до 1:53,33+10,66 к 16 пассажу. Адаптации вируса к организму новорожденных крольчат, сроки проявления клинических симптомов и гибели инфицированных животных отодвинулись на поздние сроки, по сравнению с начальным этапом репродукции, т.е. симптомы проявлялись через 26-28 ч, а падеж – 32-34 ч после инъекции им вирулентного вируса.

Была изучена динамика накопления преципитирующего антигена данного типа в мышечной ткани новорожденных крольчат. В первом и втором пассаже установлен отрицательный результат в разведениях, позитивная сыворотка положительно реагировала только с неразведенным антигеном, в разведениях получен отрицательный результат. С повышением степени пассажа активность преципитирующего антигена прогрессировала и от 3 по 11 пассаж титр в тканевой вируссодержащей суспензии не превышал значений от «цельного» до 1:3,33+0,66. С 12 пассажного уровня титр преципитирующего антигена мышечной ткани стабилизировался и к 16 пассажу репродукции он составил 1:6,66+1,33.

При титровании лапинизированного вируса на культуре клеток почек телят инфекционная активность составил 4,50+0,00 lg ТЦД50/см3. При этом установлено, что начало проявления цитопатического эффекта отмечено через 34-38 часов после инфицирования клеток монослоя, характер и картина поражения монослоя была аналогичной с типом А вируса. Площадь поражения и интенсивность цитопатогенных изменений монослоя составлял 50-60%. С 1 по 10 пассаж, по мере адаптации возбудителя к организму животных вирус активно проявлял цитопатические изменения в монослое клеток, интенсивность разрушения площади росла, титр накопления возрастал и составил от 4,50+0,00 до 6,58+0,166 lg ТЦД50/см3. Данные, представленные в таблице 6, свидетельствуют о том, что с 11 по 16 пассаж полевой изолят адаптировался к биологической системе, титры всех антигенов, особенно инфекционность достигла 7,25+0,00 lg ТЦД50/см3.

Полевой штамм типа Азия-1 активно размножался в организме новорожденных крольчат, в серологических реакциях антигены комплементсвязывающие были в титре 1:3,33+0,66, преципитирующие – 1:1,33+0,66 и инфекционная активность в пределах 5,08+0,166 lg ТЦД50/см3.

**Таблица 6 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа Азия-1 в организме крольчат**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа Азия-1 | | |
| комплементсвязы-вающий антиген | преципитирующий антиген | биологическая активность штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | I | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,08+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 5,83+0,166 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:3,33+0,66 | 6,08+0,166 |
| 6 | VI | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,33+0,166 |
| 7 | VII | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 8 | VIII | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 9 | IX | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 6,66+0,08 |
| 10 | X | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 6,83+0,166 |
| 11 | XI | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 6,83+0,166 |
| 12 | XII | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 6,91+0,083 |
| 13 | XIII | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,08+0,166 |
| 14 | XIV | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,25+0,00 |
| 15 | XV | 1:106,66+21,33 | 1:13,33+2,66 | 7,83+0,166 |
| 16 | XVI | 1:106,66+21,33 | 1:13,33+2,66 | 8,08+0,166 |

На уровне 7 и 8 пассажей в серологических реакциях и при титровании возбудителя на культуре клеток их активность не повысилась, уровень их накопления снизился до 1:6,66+1,33 – комплементсвязывающих, 1:1,33+0,66 – преципитирующих антигенов и до 5,58+0,166 lg ТЦД50/см3 инфекционная активность. Между 11 и 16 пассажами отмечено высокие титры комплементсвязывающего антигена на уровне 1:106,66+21,33, преципитирующих – 1:13,33+2,66, а активность по отношению культуры клеток достигла до 8,08+0,166 lg ТЦД50/см3.

Таким образом, все серотипы возбудителя ящура активно размножались в организме новорожденных крольчат. Комплементсвязывающие, преципитирующие и вируснейтрализующие антигены в организме крольчат, в основном, накапливаются в тканях скелетной мускулатуры. По мере адаптации возбудителя к организму крольчат клинические симптомы болезни и время падежа продлевается, что свидетельствуют о снижении вирулентности полевых штаммов относительно экспериментальных животных, но биологическая активность и титры антигенов оставались на достаточно высоком уровне.

**Адаптация возбудителя к организму морских свинок.** Адаптацию трех серотипов возбудителя ящура проводили с целью получения лабораторных вариантов штаммов, используемых при изготовлении антигенов и штаммоспецифических сывороток, а также при оценке иммунобиологических свойств инактивированных культуральных вакцин на животных. Критерием оценки адаптированности вируса к организму животных были сроки проявления характерных клинических симптомов болезни у инфицированных животных, время гибели и уровень накопления комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антигенов (табл. 7, 8, 9).

**Таблица 7 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа А в организме морских свинок**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа А | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирующий антиген | биологическая активность полевого штамма на пер-вичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 6,33+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 6,58+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 6,66+0,08 |
| 5 | V | 1:26,66+5,33 | 1:6,66+1,33 | 6,83+0,166 |
| 6 | VI | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,83+0,166 |
| 7 | VII | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,91+0,083 |
| 8 | VIII | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 7,08+0,166 |
| 9 | IX | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 7,25+0,00 |
| 10 | X | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 7,41+0,083 |
| 11 | XI | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,41+0,083 |

**Таблица 8 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа О в организме морских свинок**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящуратипа О | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирующий антиген | биологическая активность полевого штамма на пер-вичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 4,33+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 4,83+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,08+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 5 | V | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,08+0,166 |
| Продолжение таблицы 8 | | | | |
| 6 | VI | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,33+0,166 |
| 7 | VII | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,91+0,083 |
| 8 | VIII | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 7,08+0,166 |
| 9 | IX | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 7,41+0,083 |
| 10 | X | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 7,66+0,08 |
| 11 | XI | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 7,66+0,08 |

**Таблица 9 – Динамика накопления специфических антигенов вируса ящура типа Азия-1 в организме морских свинок**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Пассажный уровень полевого штамма | Специфические антигены вируса ящура типа Азия-1 | | |
| комплемент-  связывающий антиген | преципитирую-щий антиген | биологическая активность полевого штамма на первичной культ. кл. ПТ, lg ТЦД50/см3 |
| 1 | I | 1:1,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 4,33+0,166 |
| 2 | II | 1:3,33+0,66 | 1:1,33+0,66 | 4,83+0,166 |
| 3 | III | 1:6,66+1,33 | 1:1,33+0,66 | 5,08+0,166 |
| 4 | IV | 1:6,66+1,33 | 1:3,33+0,66 | 5,58+0,166 |
| 5 | V | 1:26,66+5,33 | 1:6,66+1,33 | 6,08+0,166 |
| 6 | VI | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 6,33+0,166 |
| 7 | VII | 1:13,33+2,66 | 1:6,66+1,33 | 7,41+0,083 |
| 8 | VIII | 1:13,33+2,66 | 1:13,33+2,66 | 7,41+0,083 |
| 9 | IX | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 7,66+0,08 |
| 10 | X | 1:26,66+5,33 | 1:13,33+2,66 | 8,00+0,00 |
| 11 | XI | 1:53,33+10,66 | 1:13,33+2,66 | 8,33+0,166 |

По результатам проведенных экспериментов полевые штаммы разделили условно на три группы каждого типа:

1) вирусные материалы, полученные от 1 по 7 уровень пассажа считать «Музейными»;

2) вирусные материалы, полученные от 8 по 12 уровень пассажа считать «Матриксом»;

3) вирусные материалы, полученные от 13 пассажа и выше считать «Производственными».

**Изучение чувствительности различных культур клеток к полевому штамму возбудителя ящура типов А, О и Азия-1**

Культуральные свойства полевых штаммов возбудителя ящура типов А, О и Азия-1 изучали с применением первичнотрипсинизированных культур клеток ПТ, ПС, ПЯ и перевиваемых линий МДВК, СПЭВ, Vero, ПО, РК-15, ВНК-21,ПТ-80 и ТТ. Задачей проводимых экспериментов являлось выявление чувствительных к полевым штаммам культур клеток и выбор наиболее активного продуцента вируса.

Всего на каждой культуре клеток проводили 5 пассажей и на каждом из них определяли биологическую активность вируса на соответствующей культуре клеток и на культуре клеток ВНК-21. Наличие и биологическую активность возбудителя ящура в культуре клеток, зараженной разведениями вируса, устанавливали титрованием культуральных суспензий в культуре клеток ВНК-21. Результаты исследований представлены в таблице 10.

**Таблица 10 – Биологическая активность вируса ящура типа А, репродуцированного в различных культурах клеток после заражения в состояний полного монослоя**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование  культур клеток | Биологическая активность полевого изолята вируса ящура типа А в различных культурах клеток (lg ТЦД50/см3) и пассажный уровень | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Первичнотрипсинизированные культуры клеток | | | | | |
| ПТ | 6,91+0,083 | 7,08+0,166 | 7,50+0,00 | 7,66+0,08 | 8,66+0,08 |
| ПЯ | 6,91+0,083 | 7,08+0,166 | 7,50+0,00 | 7,66+0,08 | 8,33+0,166 |
| ПС | 7,08+0,166 | 7,33+0,166 | 7,66+0,08 | 7,66+0,08 | 8,66+0,08+ |
| Перевиваемые линии культур клеток | | | | | |
| МДСК | 4,33+0,166 | 4,50+0,00 | 4,66+0,08 | 5,58+0,166 | 5,58+0,166 |
| Vero | 4,83+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 |
| ПО | 5,50+0,00 | 6,58+0,166 | 6,83+0,166 | 6,83+0,166 | 7,33+0,166 |
| СПЭВ | 5,91+0,083 | 6,66+0,08 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 | 7,41+0,083 |
| РК-15 | 4,41+0,083 | 4,58+0,166 | 5,08+0,166 | 5,66+0,08 | 6,08+0,166 |
| ВНК-21 | 6,91+0,083 | 7,08+0,166 | 7,50+0,00 | 7,66+0,08 | 8,66+0,08 |
| ПТ-80 | 6,66+0,08 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 | 7,25+0,00 | 7,41+0,083 |
| МДВК | 6,33+0,166 | 6,58+0,166 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 | 7,33+0,166 |
| ТТ | 6,00+0,00 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 | 7,25+0,00 | 7,41+0,083 |

Как следует из таблицы 10, при первичном инфицировании цитопатическое действие (ЦПД) полевого штамма вируса типа А в первичных культурах ПТ, ПС и перевиваемой ВНК-21, СПЭВ и ПТ-80 культуре клеток проявлялось спустя 24-28 часов, в дальнейшем развивалось интенсивно и на 2 сутки охватывало 60-70% площади монослоя. В культурах клеток МДВК и ПО аналогичные изменения отмечались на 10-18 часа позже, развивались сравнительно медленно, и только на 2-3 сутки площадь монослоя клеток с ЦПД достигала 40-50%. В культурах клеток РК-15, Vero и МДСК выраженного ЦПД не обнаружено, кроме слабых очаговых видоизменений клеток в монослое. В дальнейшем отмеченные поражения постепенно сглаживались и становились менее заметными.

В последующих пассажах стабильная цитопатогенная активность вируса проявлялась только в культурах клеток ВНК-21 и СПЭВ. В клеточных линиях МДСК и Vero, на втором пассаже интенсивность ЦПД возбудителя была менее заметна и слабой, а на третьем и четвертом пассажах ЦПД уже не проявлялась. В других культурах клеток со второго по пятые пассажи какие-либо патологические изменения не выявлялись.

Титры вируса с 1-го по 5-ый пассажи были заметно высокими и оставались стабильными в культуре клеток ВНК-21 и СПЭВ. В перевиваемых культурах клеток МДВК и ПТ-80 высокий титр также сохранялся с первого по пятый пассажи, полевой вирус активно репродуцировался с проявлением характерных цитопатических изменений в монослое. Но уровень накопления вируса был на один порядок ниже, чем в предыдущих культурах. Титры вируса в клетках Vero, РК-15 и МДСК были значительно ниже и с увеличением количества пассажей титры биологической активности оставались на уровне начальных пассажей.

Таким образом, к полевому штамму типа А вируса ящура из числа испытанных культур перевиваемых клеток наиболее чувствительны линии клеток ВНК-21/13, СПЭВ и ТТ. Репродукция вируса в этих клеточных культурах остается стабильной и при проведении пяти последовательных пассажей.

Изучена чувствительность различных первичнотрипсинизированных и перевиваемых культур клеток к полевому штамму серотипа О возбудителя ящура. В экспериментах использовали лапинизированный вариант полевого штамма, прошедший один пассаж через организм новорожденных крольчат с биологической активностью 5,33+0,166 lg ТЦД50/см3. Результаты исследований представлены в таблице 11.

**Таблица 11 – Чувствительность различных культур клеток к вирусу ящура типа О**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование  культур клеток | Биологическая активность полевого изолята вируса ящура типа О в различных культурах клеток (lg ТЦД50/см3) и пассажный уровень | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Первичнотрипсинизированные культуры клеток | | | | | |
| ПТ | 4,58+0,166 | 4,58+0,166 | 5,33+0,166 | 5,66+0,08 | 5,83+0,166 |
| ПЯ | 4,00+0,00 | 4,16+0,08 | 5,16+0,08 | 5,16+0,08 | 5,41+0,083 |
| ПС | 4,58+0,166 | 4,66+0,08 | 5,33+0,166 | 5,50+0,00 | 5,66+0,08 |
| Перевиваемые линии культур клеток | | | | | |
| МДСК | 3,33+0,166 | 3,50+0,00 | 4,16+0,08 | 4,16+0,08 | 4,16+0,08 |
| Vero | 3,33+0,166 | 3,50+0,00 | 4,16+0,08 | 4,16+0,08 | 4,16+0,08 |
| ПО | 4,00+0,00 | 4,16+0,08 | 5,16+0,08 | 6,08+0,166 | 7,33+0,166 |
| СПЭВ | 5,91+0,083 | 6,66+0,08 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 | 7,41+0,083 |
| РК-15 | 4,41+0,083 | 4,58+0,166 | 5,08+0,166 | 5,66+0,08 | 6,08+0,166 |
| ВНК-21 | 5,91+0,083 | 6,91+0,083 | 7,08+0,166 | 7,50+0,00 | 7,66+0,08 |
| ПТ-80 | 6,33+0,166 | 6,66+0,08 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 | 7,25+0,00 |
| МДВК | 5,91+0,083 | 6,33+0,166 | 6,58+0,166 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 |
| ТТ | 4,83+0,166 | 5,08+0,166 | 6,00+0,00 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 |

Как следует из таблицы 11, полевой штамм от возбудителя ящура активно репродуцировался с проявлением цитопатического действия в первичных культурах клеток ПТ, ПЯ, ПС и перевиваемых линиях клеток ВНК-21, СПЭВ, ПТ-80, ТТ, МДВК и ПО. Биологическая активность вируса с первого по пятый пассажи изменялась в сторону повышения с каждым этапом репродукции, инфекционность штамма по отношению культур клеток характеризовалась появлением через 16-20 часов мелко, ярко светящихся клеток, преломляющих поток света с последующим скоплением и отторжением от поверхности субстрата, образуя пустоты в монослое. На начальном этапе, при инфицировании первичных и перевиваемых культур патологическому изменению подвергались 20-30% клеток монослоя. На втором и последующих пассажах в культурах клеток ВНК-21, ТТ и СПЭВ цитопатическая активность вируса развивалась также, как и на первом пассаже, а на культуре клеток Vero, МДСК и РК-15 интенсивность ЦПД и биологическая активность была невысокой. С первого по пятый пассажи в первичных культурах клеток биологическая активность составляла от 4,00+0,00 до 5,83+0,166 lg ТЦД50/см3. На наш взгляд низкие титры возбудителя связаны с низкой пролиферативной активностью этих клеток по сравнению с перевиваемыми линиями клеток. В культурах клеток ВНК-21, ТТ и СПЭВ вирус более активно и интенсивно проявлял цитопатогенное действие, причем с повышением уровня пассажа сокращалось время проявления ЦПД и накопление высоких титров. Но инфекционная активность типового штамма по отношению первичных и перевиваемых линий культур клеток по сравнению с полевым штаммом типа А была низкой.

Изучена чувствительность различных первичнотрипсинизированных и перевиваемых культур клеток к полевому штамму типа Азия-1 возбудителя ящура. В экспериментах также использовали лапинизированный вариант полевого штамма, прошедший один пассаж через организм новорожденных крольчат с биологической активностью 5,08+0,166 lg ТЦД50/см3. Результаты исследований представлены в таблице 12.

**Таблица 12 – Чувствительность различных культур клеток к вирусу ящура типа Азия-1**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование  культур клеток | Биологическая активность полевого изолята вируса ящура типа Азия-1 в различных культурах клеток (lg ТЦД50/см3) и пассажный уровень | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Первичнотрипсинизированные культуры клеток | | | | | |
| ПТ | 4,91+0,083 | 6,08+0,166 | 6,50+0,00 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 |
| ПЯ | 4,91+0,083 | 6,08+0,166 | 6,50+0,00 | 6,66+0,08 | 7,33+0,166 |
| ПС | 5,08+0,166 | 6,33+0,166 | 6,33+0,166 | 6,66+0,08 | 7,00+0,00 |
| Перевиваемые линии культур клеток | | | | | |
| МДСК | 4,33+0,166 | 4,50+0,00 | 4,66+0,08 | 5,58+0,166 | 5,58+0,166 |
| Vero | 4,83+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 | 5,08+0,166 |
| ПО | 5,50+0,00 | 6,58+0,166 | 6,83+0,166 | 6,83+0,166 | 7,33+0,166 |
| СПЭВ | 5,91+0,083 | 6,66+0,08 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 | 7,41+0,083 |
| РК-15 | 4,41+0,083 | 4,58+0,166 | 5,08+0,166 | 5,66+0,08 | 6,08+0,166 |
| ВНК-21 | 6,91+0,083 | 7,08+0,166 | 7,50+0,00 | 7,66+0,08 | 8,66+0,08 |
| ПТ-80 | 6,66+0,08 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 | 7,25+0,00 | 7,41+0,083 |
| МДВК | 6,33+0,166 | 6,58+0,166 | 6,66+0,08 | 7,08+0,166 | 7,33+0,166 |
| ТТ | 6,00+0,00 | 6,50+0,00 | 6,83+0,166 | 7,25+0,00 | 7,41+0,083 |

Данные таблицы 12 свидетельствуют о том, что полевой штамм типа Азия-1 возбудителя ящура активно репродуцировался с проявлением характерных цитопатических изменений в первичных культурах клеток ПТ, ПЯ, ПС и перевиваемых линиях клеток ВНК-21, СПЭВ, ПТ-80, ТТ, МДВК и ПО. Биологическая активность вируса составила от 4,91+0,083 до 5,58+0,166 lg ТЦД50/см3. На втором и последующих пассажах в культурах клеток ВНК-21, ТТ и СПЭВ цитопатическая активность вируса развивалась также, как и на первом пассаже, а в культурах клеток Vero, МДСК и РК-15 интенсивность ЦПД и биологическая активность была невысокой. Штамм Азия-1 типа в культурах клеток ВНК-21, ТТ и СПЭВ более активно и интенсивно проявлял цитопатогенное действие, накапливаясь в высоких титрах (8,08+0,16 lg ТЦД50/см3). Но инфекционная активность данного типа по отношению первичных и перевиваемых линий культур клеток по сравнению с полевым штаммом типа А была также низкой.

**Накопление вируса ящура типовых штаммов в зависимости от множественности заражения**

В исследованиях использовали типовые штаммы возбудителя ящура, адаптированные к перевиваемым линиям клеток ВНК-21, ТТ и СПЭВ. Эксперименты проводили с использованием культур клеток, выращенных в 1,5 литровых матрасах стационарно и в 3-х литровых роллерных бутылях со скоростью вращения 12 об/час.

Для подбора наиболее приемлемой дозы инфицирования клеток (множественность заражения), при которой возбудитель накапливался он в наивысших титрах, выращенную культуру в одинаковых условиях культивирования, одной концентрации посева, одинакового срока инкубирования, разделили на равные партии и каждую из них инфицировали различной дозой вируса. Культивирование инфицированных культур клеток проводили в равнозначных условиях, сроках и объемах, но без замены поддерживающей среды и сыворотки крови животных. Сбор вирусного материала проводили в период максимального развития цитопатогенной активности (ЦПД) в монослое клеток замораживанием при минус 20 0С.

О приемлемости дозы вируса судили по срокам наступления, характеру развития ЦПД и по титру инфекционности собранного вирусного урожая. Результаты исследований представлены в таблице 13.

Результаты экспериментов показали, время, характер и интенсивность проявления цитопатогенных действий вируса в монослое культур клеток и биологическая активность вирусной суспензии зависела от количества инфицирующих доз вируса. Вирус наиболее активно вызывал цитопатогенное действие при инфицирующих дозах от 0,1 до 1 ТЦД50/кл на культуре клеток ВНК-21/13. Индуцируемые в клетках цитопатогенные изменения проявлялись в период от 8 часов после инфицирования и в последующие 12-16 часов подвергались дегенерации (ЦПД) более 80% клеток монослоя.

**Таблица 13 – Цитопатогенная активность вируса ящура типа А в перевиваемых линиях культур клеток при разных заражающих дозах**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид культ. клеток | Доза инфици-рования, ТЦД50/кл | Количество сосудов (матрасы), шт. | Начало проявле-ния ЦПД, ч | Срок мак-симального развития ЦПД, ч | Интенсив-ность ЦПД, % | Титр вируса, lg ТЦД50/см3 |
| СПЭВ | 1,0 | 15 | 30-48 | 4-5 | 80-90 | 8,66+0,08 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 80-90 | 8,66+0,08 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80-90 | 8,58+0,166 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 6,41+0,083 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 5,91+0,083 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-60 | 4,83+0,166 |
| ТТ | 1,0 | 15 | 30-48 | 4-5 | 80-90 | 7,58+0,166 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 80-90 | 7,08+0,166 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80-90 | 6,66+0,08 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 5,33+0,166 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 6,08+0,166 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-50 | 5,83+0,166 |
| ВНК-21/13 | 1,0 | 15 | 12-15 | 4-5 | 85-95 | 8,66+0,08 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 85-95 | 8,66+0,08 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80-90 | 8,58+0,166 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 7,41+0,083 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 6,91+0,083 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-60 | 6,33+0,166 |

Биологическая активность вирусного урожая составляла 8,66+0,08 lg ТЦД50/см3 и выше. В культуре клеток, инокулированной меньшей дозой вируса, ЦПД проявлялось по истечении 36 ч, развитие вирусных поражений имело сравнительно затяжной характер. Необходимо отметить, что при использовании множественности заражения (0,05 ТЦД50/кл и менее) цитопатогенное действие вируса распространялось на меньшее количество клеток монослоя и оно составляло 70% площади монослоя. Активность вируса в культуральной суспензии, собранной из этих матрасов, колебалась от 6,33+0,166 до 7,41+0,083 lg ТЦД50/см3.

Таким образом, для получения вирусной суспензии с высокой цитопатогенной и биологической активностью вируса ящура типа А необходимо использовать множественность заражения в пределах 0,1-1,0 ТЦД50/кл.

Полевой штамм типа О, как и тип А активно репродуцировался. На всех использованных системах культур клеток, но более активно в линии клеток ВНК-21/13. Характер и интенсивность проявления цитопатических действий вируса в монослое культур клеток и биологическая активность вирусной суспензии зависела от количества доз инфицирования. Вирус наиболее активно вызывал цитопатогенное действие при инфицирующих дозах от 0,1 до 1 ТЦД50/кл на культуре клеток ВНК-21/13 (табл. 14).

**Таблица 14 – Цитопатогенная активность вируса ящура типа O в перевиваемых линиях культур клеток при разных заражающих дозах**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид культ. клеток | Доза инфици-рования, ТЦД50/кл | Количество сосудов (матрасы), шт. | Начало проявле-ния ЦПД, ч | Срок мак-симального развития ЦПД, ч | Интенсив-ность ЦПД, % | Титр вируса, lg ТЦД50/см3 |
| СПЭВ | 1,0 | 15 | 30-48 | 4-5 | 80 и более | 7,08+0,166 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 80 и более | 6,33+0,166 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80 и более | 6,33+0,166 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 5,58+0,166 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 5,16+0,08 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-60 | 4,58+0,166 |
| ТТ | 1,0 | 15 | 30-48 | 4-5 | 80 и более | 7,08+0,166 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 80 и более | 6,33+0,166 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80 и более | 5,91+0,33 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 5,33+0,166 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 5,08+0,166 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-60 | 4,16+0,08 |
| ВНК-21/13 | 1,0 | 15 | 12-15 | 4-5 | 80 и более | 7,08+0,166 |
| 0,5 | 14 | 48 | 5 | 80 и более | 6,33+0,166 |
| 0,1 | 16 | 48-72 | 5-6 | 80 и более | 6,33+0,166 |
| 0,05 | 15 | 72 | 7 | 70-80 | 5,58+0,166 |
| 0,01 | 16 | 90 | 8-10 | 60-70 | 5,16+0,08 |
| 0,001 | 15 | 96 | 9-12 | 40-60 | 4,58+0,166 |

В следующей серии экспериментов проведены аналогичные наблюдения с серотипом Азия-1 вируса ящура по определению оптимальной дозы заражения перевиваемых культур клеток (табл. 15).

Установлено, что полевой штамм типа Азия-1 активно репродуцировался во всех системах культур клеток, но более активно в линии клеток ВНК-21/13. Вирус наиболее активно проявлял цитопатогенное действие при инфицирующих дозах от 0,1 до 1 ТЦД50/кл на культуре клеток ВНК-21/13. В зараженных клетках цитопатогенные изменения проявлялись спустя 14 часов после инфицирования и в последующие 33-38 часов подвергались дегенеративным изменениям (ЦПД) более 80% клеток монослоя. Инфекционная активность вируссодержащей суспензии установлена на уровне 8,33+0,166 lg ТЦД50/см3 и выше. В культурах клеток, зараженных меньшей дозой вируса, ЦПД проявлялось после истечение 38 ч, развитие вирусных поражений в последующем имело затяжной и продолжительный характер. При использовании множественности заражения (0,05 ТЦД50/кл и менее) цитопатогенному поражению монослоя подвергалась значительно меньшая площадь и монослоя и составила 45-55% и менее. Активность вируса культуральной суспензии, колебалась от 5,83+0,166 до 7,41+0,083 lg ТЦД50/см3.

**Таблица 15 – Цитопатогенная активность вируса ящура типа Азия-1 в перевиваемых линиях культур клеток при разных заражающих дозах**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид культ. клеток | Доза инфици-рования, ТЦД50/кл | Количество сосудов (матрасы), шт. | Начало проявле-ния ЦПД, ч | Срок мак-симального развития ЦПД, ч | Интенсив-ность ЦПД, % | Титр вируса, lg ТЦД50/см3 |
| СПЭВ | 1,0 | 5 | 4 | 4-5 | 80 | 8,66+0,08 |
| 0,5 | 5 | 4 | 5 | 80 | 8,66+0,08 |
| 0,1 | 5 | 6 | 5-6 | 80 | 7,58+0,166 |
| 0,05 | 5 | 8 | 7 | 70-80 | 7,41+0,083 |
| 0,01 | 5 | 9 | 8-10 | 60-70 | 6,91+0,083 |
| 0,001 | 5 | 16 | 9-12 | 40-60 | 6,83+0,166 |
| ТТ | 1,0 | 5 | 7 | 4-5 | 80 | 7,58+0,166 |
| 0,5 | 5 | 9 | 5 | 80 | 7,08+0,166 |
| 0,1 | 5 | 12 | 5-6 | 80 | 6,66+0,08 |
| 0,05 | 5 | 18 | 7 | 70-80 | 6,33+0,166 |
| 0,01 | 5 | 20 | 8-10 | 60-70 | 6,08+0,166 |
| 0,001 | 5 | 25 | 9-12 | 40-60 | 5,83+0,166 |
| ВНК-21/13 | 1,0 | 5 | 4 | 4-5 | 80 | 8,66+0,08 |
| 0,5 | 5 | 4 | 5 | 80 | 8,66+0,08 |
| 0,1 | 5 | 6 | 5-6 | 80 | 8,33+0,166 |
| 0,05 | 5 | 8 | 7 | 70-80 | 7,41+0,083 |
| 0,01 | 5 | 9 | 8-10 | 60-70 | 6,91+0,083 |
| 0,001 | 5 | 16 | 9-12 | 40-60 | 5,83+0,166 |

Таким образом, из всех испытанных в экспериментах первичных и перевиваемывх культур клеток более чувствительными и продуктивными для получения вируссодержащей суспензии возбудителя ящура типов А, О и Азия-1 установлены линии клеток почки сирийского хомячка, свиней и трахеи теленка. При стационарном и роллерном методах выращивания возбудителя на этих системах можно получить высокоактивную вирусную массу, удовлетворяющую требованиям нормативных стандартов при изготовлении диагностических и профилактических препаратов. Для получения вирусной суспензии с высокой цитопатогенной и биологической активностью вируса ящура типов А, О и Азия-1 необходимо использовать множественность заражения в пределах 0,01-0,05 ТЦД50/кл.

**Изучение вирулицидной активности формальдегида**

В опытах по определению режима инактивации вируса ящура использовали культуральный вариант штаммов типов А, О и Азия-1, прошедших 8 последовательных пассажей на культуре клеток ВНК-21. Для инактивации вируса использовали формальдегид в концентрациях 0,02; 0,03; 0,05 и 0,1% по отношению к общему объему биомассы. В процессе эксперимента устанавливали срок полной инактивации вируса ящура при температуре 4, 27 и 37˚С, при рН суспензии 7,4-7,6. Исходная биологическая активность вируса типа А – 8,58+0,166 lg ТЦД50/см3, типа О – 7,08+0,166 lg ТЦД50/см3 и типа Азия-1 – 7,58+0,166 lg ТЦД50/см3.

Авирулентность препаратов определяли методом бляшек на культуре клеток ВНК-21, или заражением мышат-сосунов. В результате устанавливали концентрацию инактиванта, при которой нет остаточной инфекционности. Результаты инактивации лапинизированного вируса ящура формальдегидом приведены в таблице 16.

**Таблица 16 – Инактивация лапинизированного вируса ящура формальдегидом при различной температуре и концентрации инактиванта**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентра-  ция инакти-ванта, в % | Время полной инактивации вируса ящура при температурах, часы | | | | | | | | |
| тип А | | | тип О | | | тип Азия-1 | | |
| 4ºС | 27ºС | 37ºС | 4ºС | 27ºС | 37ºС | 4ºС | 27ºС | 37ºС |
| 0,1 | 96 | 30 | 12 | 94 | 27 | 11 | 95 | 30 | 14 |
| 0,05 | 144 | 33 | 27 | 144 | 30 | 25 | 146 | 33 | 28 |
| 0,03 | 184 | 37 | 30 | 184 | 33 | 30 | 188 | 36 | 31 |
| 0,02 | 195 | 42 | 35 | 196 | 39 | 31 | 199 | 42 | 33 |

Данные таблицы 16 характеризуют вирулицидную активность различных концентраций формальдегида в отношении лапинизированного вируса ящура А, О и Азия-1 при рН суспензии 7,5 и температурных режимах 4, 27 и 37ºС.

Продолжительность инактивации вируса ящура трех типов прямо зависела от концентрации формальдегида в вирусной суспензии и температуры экспозиции. Повышение температуры инактивации в 23 и 10ºС ускорял процесс утраты инфекционности на 3,5 и 2,5 раза соответственно. Кинетика инактивации вируса ящура формальдегидом отклонялась от реакции первого порядка. Сначала наблюдали относительно резкий спад инфекционности вируса, затем следовал переход в более или менее продолжительную «логфазу». Применение 0,1% формальдегида позволял сократить время инактивации и повысить вероятность полной потери инфекционности вируса, поэтому оптимальным был признан режим инактивации вируса ящура формальдегидом в конечной концентрации 0,1% при температуре 37°С в течение 12 часов. Время инактивации для обеспечения полноты инактивации и надежности было увеличено с 12 до 24 часов.

Время инактивации других двух типов вируса совпадал с кинетикой потери инфекционности типа А, с разницей от 1 до 5 часов. Такое различие во времени связано с концентрацией вирусных частиц (146S и 75S) и количеством остаточных балластных белков в суспензии, с которыми активно вступает на взаимодействие формальдегид. Понижение концентрации инактиванта приводило к увеличению срока выживания вируса, а рост концентрации формальдегида к сокращению срока инактивации, независимо от температуры экспозиции.

Проверка авирулентности суспензий инактивированного лапинизированного вируса ящура на мышатах-сосунах сопряжена с непредвиденными случайностями, такими как неспецифическая гибель, поедание матками мышат-сосунов. Чтобы избежать искажений результатов параллельно авирулентность инактивированных препаратов определяли методом бляшек на культуре клеток ВНК-21. В последующих экспериментах инфекционная активность вируса ящура типов А, О и Азия-1 до начало опытов определялась на мышатах-сосунах и на перевиваемой линии клеток ВНК-21.

**Изучение вирулицидной активности димера этиленимина**

При изучении инактивирующего димера этиленимина на вирус ящура в аналогичных опытах получены следующие результаты (табл. 17).

**Таблица 17 – Динамика инактивации лапинизированного вируса ящура димерэтиленимином**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентра-  ция инакти-ванта, в % | Время полной инактивации вируса ящура при температурах, часы | | | | | | | | |
| тип А | | | тип О | | | тип Азия-1 | | |
| 4ºС | 27ºС | 37ºС | 4ºС | 27ºС | 37ºС | 4ºС | 27ºС | 37ºС |
| 0,04 | 96 | 24 | 8 | 94 | 19 | 7 | 96 | 22 | 8 |
| 0,02 | 122 | 26 | 12 | 124 | 25 | 11 | 146 | 23 | 13 |
| 0,015 | 130 | 29 | 16 | 148 | 27 | 25 | 149 | 27 | 17 |
| 0,01 | 162 | 31 | 19 | 163 | 30 | 29 | 162 | 30 | 20 |
| 0,005 | 192 | 36 | 26 | 189 | 35 | 25 | 188 | 32 | 26 |

Установлено, что скорость инактивации вируса ящура при использовании ДЭИ в конечной концентрации 0,04% выше, чем в растворах, содержащих 0,02-0,005% инактиванта. Димерэтиленимин в концентрации 0,04 % инактивировал вирус ящура через 8 часов после начала эксперимента, а в концентрации димера 0,02 % через 12ч. Следовательно, чем выше концентрация реагента в биомассе и температурный режим, тем она активнее нейтрализует инфекционную активность возбудителя, что соответствует реакции первого порядка. Экспериментально также установлено, что повышение температурного режима с 4ºС до 37ºС приводит к значительному повышению скорости инактивации. В связи с тем, что длительное воздействие инактиванта может привести к повреждению антигена (нативного вируса), а также для сокращения времени технологического процесса приготовления инактивированной вакцины, в качестве оптимальной была принята температура инактивации 37 °С.

Таким образом установлено, что оптимальным режимом инактивации возбудителя ящура всех трех типов является использование 0,04% димера этиленимина при температуре 37°С в течение 24 часов. Время инактивации для надежности было увеличено с 8 до 24 часов.

Инактивированные вируссодержащие суспензии типов А, О и Азия-1 вируса ящура были авирулентными для перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13 и для мышат-сосунов.

**Отработка методов очистки культурального вируса ящура серотипов А, О и Азия-1**

В работе изучали активность различные концентраций хлороформа в отношении культуральной вируссодержащей суспензии возбудителя ящура.

Штаммы серотипов А, О и Азия-1 репродуцировали на перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13 изолированные в боксах. Для удаления из вирусной суспензии грубых клеточных детритов биомассу подвергали низкоскоростному центрифугированию при 5000 об/мин в течение 30 минут, после чего приступали к очистке химреагентом. Для этого биологическую массу возбудителя ящура добавляли хлороформ в конечных концентрациях 2, 4, 8 и 12% после 10 минутного интенсивного перемешивания пробы суспензии центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 минут. Концентрацию остаточных балластных белков в очищенной суспензии определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм при контроле раствора Хенкса. Результаты исследований представлены в таблице 18.

**Таблица 18 – Очистка культуральной суспензии возбудителя ящура хлороформом разной концентрации**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вирус ящура | Конц. балластного белка до очистки, мг% | Конц. хлороформа в культуральной суспензии | Конц. балл. белка после очистки хлороформом мг% |
| Тип А | 38,0 | 2 | 29,0 |
| 4 | 27,0 |
| 8 | 25,0 |
| 12 | 23,0 |
| Тип О | 36,0 | 2 | 27,0 |
| 4 | 25,0 |
| 8 | 25,0 |
| 12 | 24,0 |
| Тип Азия-1 | 39,0 | 2 | 28,0 |
| 4 | 24,0 |
| 8 | 25,0 |
| 12 | 22,0 |

Замораживание и оттаивание вируссодержащих суспензий серотипов способствовала частичному осветлению биологического материала. Часть белковых веществ при этом утрачивала растворимость и вместе с клеточным детритом удалялась центрифугированием. Данный процесс приводил к снижению концентрации балластных белков до 36 мг% в серотипных суспензиях. Добавление флокулянта различных концентрации в вируссодержащие суспензии и последующее центрифугирование снижало присутствие балластных растворенных белков до 22-29мг%, то есть на 25-43%. Повышение концентрации хлороформа в суспензиях даже в 6 раз не привело к снижению балластных белков после очистки. Возможно, это обусловлено низким содержанием растворенных белковых веществ в суспензии культурального вируса после замораживания и размораживания.

**Влияние методов очистки на инфекционную активность, концентрацию 146S частиц и иммуногенные свойства культурального вируса ящура типов А, О и Азия-1**

В процессе очистки биологической массы культурального вируса хлороформом различных концентраций может происходить разрушение вирусных частиц (146S). Необходимо контролировать титр инфекционности и компонентный состав возбудителя. Биологическая активность культурального вируса до и после очистки хлороформом в наших исследованиях находилась под постоянным контролем. Данные эксперимента приведены в таблице 19.

**Таблица 19 – Влияние концентрации хлороформа на биологическую активность культурального вируса ящура типов А, О и Азия-1**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вирус ящура | Титр вируса до очистки,  lg ЛД50/см3 | Конц. хлороформа в тканевой суспензии | Титр вируса после очистки,  lg ЛД50/см3 |
| Тип А | 8,41+0,08 | 2 | 8,41+0,08 |
| 4 | 8,33+0,17 |
| 8 | 8,16+0,08 |
| 12 | 8,16+0,08 |
| Тип О | 7,83+0,16 | 2 | 7,83+0,16 |
| 4 | 7,41+0,33 |
| 8 | 7,33+0,16 |
| 12 | 7,33+0,16 |
| Тип Азия-1 | 8,16+0,08 | 2 | 8,08+0,17 |
| 4 | 7,91+0,33 |
| 8 | 7,83+0,16 |
| 12 | 7,83+0,16 |

В эксперименте испытаны 2,4 и 8% концентрация хлороформа, как показали результаты, титр вируса после очистки мало изменился, был достаточно стабильным. Следовательно, использованные для очистки концентрации флокулянта не снижает инфекционную активность всех типов возбудителя ящура, хотя высокие концентрации химреагента способствовали снижению балластных белков в суспензии.

При производстве противовирусных профилактических препаратов компонентный состав является необходимым критерием оценки потерь возбудителя инфекции в результате очистки системы репродукции от балластных белков. Это приобретает особенный характер при производстве противоящурных инактивированных моно-, би- и поливалентных вакцин.

**Таблица 20 – Влияние хлороформа на концентрацию 146S компонента в культуральной суспензии вируса ящура**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Вирус ящура | Концентрация 146S частиц (мкг/мл) после очистки | | | |
| концентрация хлороформа в культуральной суспензии | | | |
| 2% | 4% | 8% | 12% |
| Тип А | 1,7 | 1,8 | 1,8 | 1,9 |
| Тип О | 0,9 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| Тип Азия-1 | 1,4 | 1,5 | 1,5 | 1,6 |

Данные лабораторных исследований свидетельствуют о том, что различия в массе 146S компонента возбудителя ящура типов А, О и Азия-1 при использовании низкой и при высоких концентрациях хлороформа несущественны. В этом случае трудно отдать предпочтение одному из показателей концентрации флокулянта, использованных при очистке. Если же взять во внимание стоимость флокулянта, влияющего, в конечном счете, на себестоимость вакцины, вполне возможно ограничиться минимальной концентрацией хлороформа – 2% (табл. 20).

Из культуральной вирусной суспензии типов А, О и Азия-1, очищенной 0,2% хлороформом и инактивированной формальдегидом 0,2% концентрации, приготовили моновалентный адсорбат ГОА-вакцины при конечной концентрации сорбента 1% и сапонина 0,05%. Иммуногенную активность моновалентной вакцин против ящура изучали на взрослых белых мышах. Результаты эксперимента представлены в таблице 21.

**Таблица 21 – Иммуногенная активность культурального вируса ящура типов А, О и Азия-1, очищенного хлороформом различной концентрации**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вирус ящура | ИмД50 М после очистки вируса хлороформом | | | | |
| контроль.  суспензия  не очищ-я | очищенная 2% хлоро-формом | очищенная  4% хлоро-формом | очищенная  8% хлоро-формом | очищенная  12% хлоро-формом |
| Тип А | 0,08 | 0,014 | 0,015 | 0,013 | 0,013 |
| Тип О | 0,24 | 0,22 | 0,23 | 0,21 | 0,21 |
| Тип Азия-1 | 0,15 | 0,17 | 0,15 | 0,16 | 0,16 |

Иммуногенность вакцины против ящура типа А, очищенного флокулянтом разной концентрации, была в пределах 0,08-0,015 см3, и не имела существенных различий в сравнение с иммуногенностью вакцин из нативного культурального вируса. Иммуногенная активность возбудителя ящура типов О и Азия-1, обработанного хлороформом различных концентраций составляла от 0,22 до 0,24 см3 против типа О и от 0,15 до 0,17 см3 против типа Азия-1.

Опыта и установлено, что потерь 146S частиц в очищенных препаратах и снижения иммуногенности не отмечено.

**Изучение динамики иммуногенеза (сроков наступления, продолжительности и напряженности иммунитета) у морских свинок, крупного рогатого скота и свиней, привитых культуральной трехвалентной эмульсионной вакциной против ящура типов А. О и Азия-1**

При разработке профилактических препаратов основными критериями контроля их качества и эффективности являются сроки индуцирования иммунитета, его напряженность и продолжительность. Для изучения иммунобиологических свойств разработанной инактивированной трехвалентной культуральной вакцины против ящура использовали морских свинок, крупный рогатый скот и свиней.

Морских свинок разделили на группы, по три головы в каждой, одну группу животных оставили в качестве контрольной. Через 7, 14, и 21 сутки после иммунизации у животных исследовали пробы крови на наличие комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител против вируса ящура типов А, О и Азия-1. Для определения напряженности иммунитета на 14 и 21 сутки после введения препарата проводили контрольное заражение вирулентным вирусом соответствующего типа. Результаты исследований представлены на таблице 22.

**Таблица 22 – Титр комплементсвязывающих антител у морских свинок, привитых универсальной инактивированной трехвалентной вакциной против ящура типов А, О и Азия-1**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тип вируса ящура | Титры комплементсвязывающих антител, через сут. | | |
| 7 | 14 | 21 |
| А | 1:3,33+0,66 | 1:13,33+2,66 | 1:26,66+5,33 |
| О | 1:1,33+0,66 | 1:6,66+1,33 | 1:13,33+2,66 |
| Азия-1 | 1:3,33+0,66 | 1:13,33+2,66 | 1:26,66+5,33 |

Данные таблицы 22 показывают, что у иммунизированных морских свинок на 7 сутки титры комплементсвязывающих антител против ящура типов А, О и Азия-1 были от 1:1,33+0,66 до 1:3,33+0,66, на 14 сутки после иммунизации от 1:6,66+1,33 до 1:13,33+2,66. Далее их уровень постепенно прогрессировал и на 21 сутки титр типоспецифических антител против вируса типа А был 1:26,66+5,33, против типа О – 1:13,33+2,66 и против типа Азия-1 – 1:26,66+5,33. Установлено, что титр комплементсвязывающих антител против вируса типа О был на один порядок ниже, чем против других типов, что обусловлено типовой иммунобиологической особенностью возбудителя ящура.

Следующим этапом исследований было определение уровня вируснейтрализующих антител. Этот класс антител является важным показателем иммуногенной активности инактивированной вакцины против ящура. Результаты исследований представлены в таблице 23.

**Таблица 23 – Титр вируснейтрализующих антител у морских свинок, привитых универсальной инактивированной трехвалентной вакциной против ящура типов А, О и Азия-1**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Типы вируса ящура | Титры вируснейтрализующих антител через сут. | | |
| 7 | 14 | 21 |
| А | 1:6,66+1,33 | 1:13,33+2,66 | 1:26,66+5,33 |
| О | 1:3,33+0,66 | 1:6,66+1,33 | 1:13,33+2,66 |
| Азия-1 | 1:6,66+1,33 | 1:13,33+2,66 | 1:26,66+5,33 |

Опытом установлено, что динамика образования антител против трех типоспецифических антигенов складывалась равномерно и на 7 день, после прививки, титр составил от 1:3,33+0,66 до 1:6,66+1,33, на 21 сутки после иммунизации уровень антител повысился до 1:26,66+5,33.

Однако данные серологических тестов еще не гарантируют полного соответствия профилактического препарата отечественным или международным стандартам качества. Поэтому для оценки напряженности иммунитета привитых животных через 14 и 21 сутки после иммунизации подвергали контрольному инфицированию штаммами вируса ящура трех типов. гомологичным вакцинному, в дозе 104 ИД50/01см3 (табл. 24).

**Таблица 24 – Результаты контрольного заражения морских свинок**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Тип возбудителя ящура | Сроки контрольного заражения животных, сут. | | | |
| 14 | контрольная группа | 21 | контрольная группа |
| А | 3/0 | 3/3 | 3/0 | 3/3 |
| О | 3/1 | 3/3 | 3/0 | 3/3 |
| Азия-1 | 3/0 | 3/3 | 3/0 | 3/3 |
| Примечание: 1 – в числителе - количество животных, взятых в опыт;  2 – в знаменателе -количество заболевших животных. | | | | |

Инактивированная вакцина через 14 суток после вакцинации предохраняла от заражения вирулентным вирусом 88,8% животных, а через 21 сутки – 100%. У морских свинок контрольной группы на 4-5 сутки после инъекции вирулентного вируса отмечались характерные клинические симптомы ящура и у них была установлена генерализованная форма болезни.

**Изучение динамики образования вируснейтрализующих антител и продолжительности иммунитета у животных, привитых трехвалентной культуральной инактивированной вакциной против ящура**

Для изучения продолжительности иммунитета, создаваемого инактивированной вакциной, использовали 15 здоровых взрослых морских свинок массой 300-350 г. Животных привили вакциной в иммунизирующей дозе однократно. Через 21, 30, 60, 90, 120, 150 и 180 сут после прививки у них исследовали сыворотку крови на наличие комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител. Через 6 мес после вакцинации животных подвергали контрольному заражению вирусом ящура, гомологичному вакцинному, в дозе 104 ПД50/01см3. Продолжительность и напряженность иммунитета оценивали по титру специфических антител и устойчивости животных к заболеванию при заражении вирулентным вирусом. Данные проведенных исследований приведены в таблице 25.

**Таблица 25 – Продолжительность иммунитета у морских свинок, индуцированных трехвалентной инактивированной вакциной против ящура сельскохозяйственных животных**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Специфичес-кие антитела | Сроки исследования сывороток крови животных и титры антител, дни | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 | 330 | 360 |
| **Против типа А** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | Ц |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| **Против типа О** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | Ц | - |
| Пр АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | Ц | - | н/и |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | 1:2 |
| **Против типа Азия-1** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | Ц | - |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| Примечания: «КС АТ» - комплементсвязывающие антитела;  «Пр АТ» - преципитирующие антитела;  «ВН АТ» - вируснейтрализующие антитела. | | | | | | | | | | | | | |

Результаты исследований свидетельствуют о том, что динамика образования антител в организме иммунизированных животных происходила равномерно. На 21 сутки после вакцинации титры комплементсвязывающих антител против вируса типа А составили 1:32, преципитирующих – 1:16 и вируснейтрализующих – 1:32. Далее титры специфических антител динамично прогрессировали, достигая максимума от 1:32 до 1:64 к 90 и 150 дн после прививки. После 150 дней титры специфических антител к вирусу ящура снижались, и к 360 дню они были в пределах от цельного до 1:4. При этом уровень преципитирующих антител был на один порядок ниже. В этот срок для определения напряженности и продолжительности иммунитета животных подвергали контрольному заражению эпизоотическим штаммом вируса ящура типов А, О и Азия-1 (табл. 26).

**Таблица 26 – Продолжительность иммунитета у вакцинированных морских свинок**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Типы вируса ящура | Сроки контрольного заражения животных, сут | | |
| 180 | 360 | Контрольная группа |
| А | 5/0 | 5/0 | 3/3 |
| О | 5/0 | 4/1 | 3/3 |
| Азия-1 | 5/0 | 4/1 | 3/3 |
| Примечания: 1 – в числителе - количество животных, взятых в опыт;  2 – в знаменателе - количество заболевших животных. | | | |

Опытом установлено, что при контрольном заражении вакцинированных животных через 360 суток после иммунизации животные противостояли вирулентным штаммам трех типов, ому штамму типа А, по четыре из пяти голов вирулентным штаммам типов О и Азия-1, по одному из голов обеих групп животных переболели легкой форме ящура, тогда как у животных контрольной группы на 4-5 сутки после инфицирования наблюдали характерные клинические симптомы ящура с последующей генерализацией инфекционного процесса. Из данных таблицы также следует, что специфических антител против вируса ящура обнаруживали до 12 месячного срока и при контрольном заражении вирулентными штаммами возбудителя в дозе 10-4 ИД50 все привитые животные противостояли к штамму типа А, а из группы О и Азия-1 80% иммунных особей. Положительно реагировавшие на ведение вирулентных штаммов типов О и Азия-1 переболели ящуром в легкой форме без генерализации инфекционного процесса. Заболевание животных контрольной группы подтверждено в реакциях связывания комплемента и нейтрализации. Таким образом, как показали лабораторные испытания, трехвалентная вакцина обладает протективным свойством и стимулирует специфический иммунитет у вакцинированных животных к полевому штамму ящура продолжительностью не менее 12 месяцев.

В экспериментах по изучению иммунобиологических свойств лабораторных образцов культуральной инактивированной вакцины против ящура типов А, О и Азия-1 использовали интактный крупный рогатый скот. Забор крови для исследования производили до и через 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 и 360 суток после иммунизации. Результаты лабораторных исследований изложены в таблице 27.

**Таблица 27 - Динамики иммуногенеза и продолжительность иммунитета у крупного рогатого скота, привитого инактивированной культуральной вакциной против ящура типов А, О и Азия-1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Специфичес-кие антитела | Сроки исследования сывороток крови животных и титры антител, дни | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 | 330 | 360 |
| **Против типа А** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | Ц |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| **Против типа О** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:16 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:4 | 1:2 | Ц |
| Пр АТ | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | 1:Ц | - |
| ВН АТ | 1:16 | 1:16 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:4 | 1:4 |
| **Против типа Азия-1** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:Ц | - |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| Примечания: «КС АТ» - комплементсвязывающие антитела;  «Пр АТ» - преципитирующие антитела;  «ВН АТ» - вируснейтрализующие антитела. | | | | | | | | | | | | | |

Как установлено опытами, вакцина активно стимулирует формирование специфического иммунитета, начиная с 7 дня после инъекции препарата против трех типов вируса на 14 сутки после иммунизации средний титр специфических антител составил от 1:4 до 1:8. Далее содержание их в сыворотке увеличивалось, достигая максимума к 90-му дню (1:64 в реакции нейтрализации). Снижение титра специфических антител отмечено со 120 дня после прививки. Спустя 12 месяцев после введения препарата установлен минимальный титр комплементсвязывающих антител на уровне 1:4, преципитирующих - 1:2 и вируснейтрализующих - 1:4.

При изучении динамики образования специфического иммунитета против возбудителя ящура на свиньях получены идентичные результаты, которые представлены в таблице 28.

**Таблица 28 - Динамика иммуногенеза и продолжительность иммунитета у свиней, привитых инактивированной культуральной вакциной против ящура типов А, О и Азия-1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Специфичес-кие антитела | Сроки исследования сывороток крови животных и титры антител, дни | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 | 330 | 360 |
| **Против типа А** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:16 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | Ц |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| **Против типа О** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:16 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:4 | 1:2 | Ц |
| Пр АТ | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:2 | 1:Ц | - |
| ВН АТ | 1:16 | 1:16 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 | 1:4 | 1:4 |
| **Против типа Азия-1** | | | | | | | | | | | | | |
| КС АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:8 | 1:4 |
| Пр АТ | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 1:4 | 1:Ц | - |
| ВН АТ | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:16 | 1:18 | 1:8 | 1:4 | 1:2 |
| Примечания: «КС АТ» - комплементсвязывающие антитела;  «Пр АТ» - преципитирующие антитела;  «ВН АТ» - вируснейтрализующие антитела. | | | | | | | | | | | | | |

Данные таблицы 28 указывают, что в организме свиней культуральная универсальная вакцина также активно стимулирует формирование специфического иммунитета начиная с 7 дня после инъекции. Максимальный титр антител также установлен к 90-120-му дням после вакцинации (1:64 в реакции нейтрализации). Спустя 120-150 дней титр комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител плавно снижался, достигая минимального значения к 360 дню после иммунизации.

**ВЫВОДЫ**

1. Впервые на территории Республики Казахстан зарегистрирован и выделен полевой изолят вируса ящура типа Азия-1 и паспортизирован как производственный штамм «Шелек-2004». Штамм «Шелек-2004» серотипа Азия-1 возбудителя ящура сельскохозяйственных животных депонирован в коллекции штаммов микроорганизмов лаборатории вирусологии ТОО «КазНИВИ», обладает высокой антигенностью, патогенностью по отношению к мышатам-сосунам, новорожденным крольчатам, взрослым морским свинкам и белым мышам и накапливается в их организме в инфекционном титре до 8,66+0,08 lg ЛД50/СМ3.
2. Получены и адаптированы к организму новорожденных крольчат, мышат-сосунов, взрослых былых мышей и морских свинок, лабораторные штаммы вируса ящура серотипов А, О и Азия-1; паспортизированы и заложены на хранение.
3. Изучены культуральные свойства штаммов серотипов А, О и Азия-1 в первичных культурах клеток ПТ, ПЯ, ПС и перевиваемых линиях клеток ВНК-21, ТТ, МДВК, СПЭВ, отработана технология получения вируссодержащей суспензии; биологическая активность культурального вируса составляет в пределах 6,58+0,166-8,66+0,08 lg ТЦД50/см3, титры комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антиегенов в титрах от 1:1,33+0,66 до 1:13,33+2,66.
4. На основе производственных штаммов серотипов А, О и Азия-1 вируса ящура разработана технология изготовления диагностических антигенов и штаммоспецифических сывороток, используемых для ретроспективной диагностики, индикации и идентификации полевых изолятов возбудителя ящура в серологических реакциях.
5. Впервые в биотехнологической практике Республики Казахстан разработана технология изготовления высокоиммуногенной инактивированной трехвалентной культуральной эмульгированной вакцины против ящура парнокопытных животных на основе местных штаммов вируса ящура с использованием подобранных монтанидов.
6. Трехвалентная эмульгированная вакцина содержит 6,66-7,69 протективных доз, у двукратно привитых лабораторных и сельскохозяйственных животных в дозе 2 мл вакцина индуцирует напряженный иммунитет на 21-е сутки после ревакцинации продолжительностью 12 мес. Иммунобиологические свойства вакцины сохраняются без существенного изменения в течение 18 мес. при температуре хранения 4-8 °С (срок наблюдения).

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для практического использования предлагаются следующие нормативно-технические документы.

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена О вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению типоспецифического антигена Азия-1 вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу О вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях;

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению штаммоспецифических сывороток к типу А вируса ящура для лабораторной диагностики ящура и идентификации возбудителя болезни в серологических реакциях.

Комплект нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и применению инактивириованной культуральной эмульсионной трехвалентной вакцины против ящура парнокопытных животных типов А, О и Азия-1.

**Список опубликованных трудов по теме диссертации**

1. Эпизоотические прогнозирования ящура сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан [Текст] [Ж.О.Омиржанов, М.Ф.Мададов, А.А.Абишов и др.] // Вестник с.-х. наук Казахстана. 2002. -№?. –С.34-35.

2. Абишов, А.А. Индикация и адаптация вируса ящура типа Азия 1 Достижения ветеринарной науки Казахстана в решении проблем защиты животных от инфекционных и инвазионных болезней [Текст] / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.Т. Майхин // Сборник научных трудов, посвященных 100-летию КазНИВИ - Алматы, 2005. – Т L1. – С. 8-12.

3. Абишов, А.А. Получения антигена типа Азия-1 для серологических реакций при ящуре животных Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве Казахстана [Текст] / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.Т. Майхин // Сборник научных трудов "КазНИВИ"- Алматы, 2006 – Т LII. - С. 8-12.

4. Абишов, А.А. Получение гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа Азия–1. [Текст] / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве Казахстана Сборник научных трудов КазНИВИ. – Алматы, 2007. – Т LIIΙ. – С. 17-25.

5. Абишов, А.А. Адаптация полевого изолята вируса ящура типа Азия-1 к перевиваемой культуре клеток [Текст] / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, О.У. Есходжаев, Б.С. Калисынов // Сборник трудов КазНИВИ. Алматы, 2011. - Т LVII. - С. 25-28.

6. Абишов, А.А. Адаптация полевого изолята вируса ящура типа А к перевиваемой культуре клеток [Текст] / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, О.У. Есходжаев, Б.С. Калисынов //Хабарлары известия НАН РК № 4 04, 2011. - Алматы. – 58 с.

7. Әбішев, Ә.Ә. Аусыл вирусының далалық штамының О типіне әр түрлі жасуша өсінділерінің сезімталдығы [Текст] / Ә.Ә. Әбішев, Қ.А. Хайруллаева // Жаршы Ғылыми – сараптамалық журнал. – Алматы, 2012. - № 8(08). – С. 52-55.

8. Абишов, А.А. Динамика накопления антигенов полевого штамма вируса ящура серотипаАзия-1 на перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13 [Текст] / А.А. Абишов // «Ізденістер мен нәтижелер. Исследования и результаты» Журнал КазНАУ. - Алматы, 2015. - С. 5-9.

9. Абишов, А.А. Протективные свойства экспериментальной инактивированной культуральной вакцины против серотипа Азия-1 вируса ящура [Текст] / А.А. Абишов // «Ізденістер мен нәтижелер, Исследования и результаты» Журнал КазНАУ. - Алматы, 2015. - С. 10-14.

10. Абишов, А.А. Активность штаммоспецифических сывороток против серотипа Азия-1 возбудителя ящура в серологических реакциях [Текст] / А.А. Абишов // «Наука, образование, общество: проблемы и перспективы развития: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 31 июля 2015 г. – Т. 2. - Тамбов, 2015. - С. 8-10 (РИНЦ).

11. Абишов А.А. Параметры инактивации серотипа Азия-1 возбудителя ящура [Текст] / А.А. Абишов // Наука, образование, общество: проблемы и перспективы развития: сборник научных трудов по материалам Международной научно- практической конференции 31июля 2015 г. (РИНЦ). – Т. 2. - Тамбов, 2015. - С. 10-11.

12. Пред. пат. № 10642 РК, МПК7 А 61 К 39. Штамм PICORNAVIRUSAPHTAE типа А «Алматы-2000» - ПК № 0012, используемый для приготовления культуральной вакцины против ящура / М.Ф. Мададов, Ж.А. Омиржанов, Ю.Х. Бахтахунов, А.А. Абишов // Опб. 01.06.2000 г.

13. Пред. пат. № 14295 РК, МПК7 А 61 К 39/135 Способ получения антигена для серологической диагностики ящура животных / Ю.Х. Бахтахунов, М.Ф. Мададов, А.А. Абишов, К.Т. Майхин (РК); КазНИВИ (РК)-2003/0447.1; Заяв. 04.04.2003; Опубл. 05.05.2004, Бюл. № 5; Приоритет 04.04.2003 (РК). – 4 с.

14. Пред. пат. № 14640 РК, МПК7 А 61 К 39/42, А 61К 35/16 . Способ получения сыворотки для диагностики ящура животных / Ю.Х. Бахтахунов, М.Ф. Мададов, А.А. Абишов, К.Т. Майхин // (РК); КазНИВИ (РК)-2003/0503.1; Заяв. 23.04.2003.

15. Пред. пат. № 16060 РК, МПК7 А 61 К 39, Способ получения антигена типа О для серологических реакций при ящуре животных / М.Ф. Мададов, Ю.Х. Бахтахунов, А.А. Абишов, К.Т. Майхин // 2004/0667/1 от 12.05.04 г.

16. Пред. пат. № 15980 РК, МПК7 А 61 К 39. Штамм вируса ящура типа Азия-1, пригодный для изготовления вакцинных и диагностических биопрепаратов / М.Ф. Мададов, А.А. Абишов, К.Т. Майхин // Приоритетная справка 2004/0751 от 28.05.2004 г. – КазНИВИ. - № 13.

17. Инн. пат. № 17612 РК, МПК7 А 61 К 39/42, А 61К 35/16. 2006 г. Способ получения антигена типа Азия-1 для серологической реакции при ящуре животных / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.Т. Майхин // 29.04.2005 г.

18. Инн. пат. № 20769 РК, Способ получения гипериммунной сыворотки типа Азия-1 / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов // 09.04.2007 г.

19. Инн. патент РК № 23108 «Способ получения инактивированной культуральной вакцины против ящура из штамма Picornavirus aphtae AV – 0027 (КазНИВИ) типа Азия-1» / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А.Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 06.11.2009.

20. Инн. патент РК № 25408 «Способ получения антигена из штамма вируса ящура типа А для серологических реакций при ящуре животных» / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 10.06.2011.

21. Инн. патент РК № 25409 «Способ получения антигена из штамма вируса ящура типа Азия-1 для серологических реакций при ящуре животных» / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 28.06.2011.

22. Инн. патент РК № 25462 «Способ получения антигена из штамма вируса ящура типа О для серологических реакций при ящуре животных» / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 03.06.2011.

23. Инн. патент РК № 25403 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа А / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 28.06.2011.

24. Инн. патент РК № 25401 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа Азия-1 / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 28.06.2011.

25. Инн. патент РК № 25402 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа О / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева, Б.С. Калисынов, О.У. Есходжаев // 28.06.2011.

26. Инн. патент РК № 29279 «Штамм Picornovirus aphtae AV–0266 вируса ящура типа Азия-1 для изготовления диагностических и вакцинных препаратов» /А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2014, Бюл. -№ 12. - 3 с.

27. Инн. патент РК № 29280 «Штамм Picornovirus aphtae AV – 0267 вируса ящура типа О для изготовления диагностических и вакцинных препаратов» /А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2014, Бюл. - № 12. – 3 с.

28. Инн. патент РК № 29717 «Способ изготовления инактивированной трехвалентной вакцины против ящура» / А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева // 15.05.2014.

29. Инн. патент РК № 20480 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа А / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2008, бюл. - № 12.

30. Инн. патент РК № 20481 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа О / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2008, бюл. - № 12.

31. Инн. патент РК № 20492 «Способ получения антигена вируса ящура типа А для серологических реакций» / А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2008, бюл. - № 12.

32. Инн. патент РК № 20493 «Способ получения антигена вируса ящура типа О для серологических реакций» / А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2008, бюл. - № 12.

33. Инн. патент РК № 21815 «Способ получения антигена вируса ящура типа Азия-1 для серологических реакций» / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева // 15.10.2009.

34. Инн. патент РК № 20479 «Способ получения гипериммунной сыворотки к вирусу ящура типа Азия-1 / А.А. Абишов, М.Ф. Мададов, К.А. Хайруллаева // 15.12.2008, бюл. - № 12.

35. Абишов, А.А. Иммуногенная активность инактивированной культуральной вакцины против серотипа О возбудителя ящура [Текст] / А.А. Абишов // Интернет-журнал ВАК Кыргызской Республики. - Бишкек, 06.2015 г.

36. Абишов, А.А .Серологическая активность штаммоспецифических сывороток к серотипу А возбудителя ящура [Текст] / А.А. Абишов // Интернет-журнал ВАК Кыргызской Республики. - Бишкек, 06.2015 г.

37. Абишов, А.А. Вопросы профилактики и диагностики ящура сельскохозяйственных животных [Текст] / А.А. Абишов // Монография. - Алматы, 2015. - 223 с.

38. Инн. патент РК № 30408 «Штамм Picornovirus aphtae AV – 0265 вируса ящура типа А для изготовления диагностических и вакцинных препаратов» /А.А. Абишов, К.А. Хайруллаева //11.02.2014, Бюл. - № 2. – 3 с.

**Абдикалык Абдижаппаровичтин**

**“Ача туяктуу малдын шарп ылаңын алдын алуусу жана диагностикасы” темасында 06.02.02 - ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксиколгия жана иммунология адистиги боюнча ветеринария илимдеринин доктору даражасын коргоочу диссертациясынын**

**КОРУТУНДУСУ**

**Негизги сөздөр:** шарп, А, О жана Азия-1 серотиптери, антиген, антитела, иммунитет, кандын сары суусу, вакцина, иммунизация, адьювант, вируленттүүлүк.

**Изилдөөнүн объектиси:** айыл чарба жана лабораториялык жандыктар, Казахстан Республикасынын аймагында бөлүнүп алынган жана идентификацияланган шарптын ылаңдаткычынын А, О жана Азия-1 типтеринин штаммдары.

**Изилдөөнүн предмети:** шарптын ылаңдаткычынын А, О Азия-1 тибинин штаммдары, антигендер, антитела, адьюванттар, клеткалык культуралар.

**Иштин максаты:** Казахстан Республикасынын аймагында бөлүнүп алынган шарптын талаа вирусунун штаммдарынын иммундук биологиялык касиеттерин изилдөө жана алардын негизинде диагностикалык жана алдын алуучу дары – дармектерди даярдоонун технологиясын иштеп чыгуу.

**Изилдөөнүн материалы жана ыкмалары**: шарптын вирусунун талаа жана лабораторялык штаммдары, клиникалык, патологоанатомиялык, вирусологиялык, серологиялык, микробиологиялык жана эпизоотологиялык ыкмалар.

**Алынган натыйжалар:** вирусологиялык жана серологиялык ыкма боюнча изилденип, шарптын вирусунун Азия-1 талаа тиби бөлүндү жана идентификацияланды. А, О жана Азия-1 талаа жана лабораториялык штаммдарынын иммундук биологиялык касиеттери изилденди, вирустун биологиялык массасын алуунун жол – жоболору иштелип чыкты; серологиялык ыкма боюнча шарпка типизация жүргүзүп, диагноз коюуу үчүн А, О жана Азия-1 типтерге типоспецификациялык антигендерди жана штаммдардын атайын сары суусун даярдоонун технологиясы иштелип чыкты. Ылаңдаткычтын жергиликтүү изолятынын негизинде ача туяктуу малдын шарп ылаңына каршы үч валенттүү универсалдык инактивацияланган культуралдык вакцинанын өздөштүрүлгөн технологиясы иштелип чыкты.

**Изилдөөнүн жаңычылыгы:** шарптын вирусунун А, О жанаАзия-1 типтеринин штаммдары алынды, антигендерди, сары сууну, үч валенттүү универсалдык инактивацияланган культуралдык вакцинаны даярдоонун универсалдык технологиясы иштелип чыкты.

**Колдонуунун деңгээли:** антигендерди, атайын сары сууну жана шарпка каршы үч валенттүү вакцинаны колдонуунун иштелип чыккан жаны ыкмаларынын даярдоосунун, көзөмөлдөөсүнүн жана колдонуусунун нормативдик иш кагаздары даярдалып, сунушталды.

**Колдонуу чөйрөсү:** ветеринардык практика жана ветеринардык диагностикалык лаборатория.

**РЕЗЮМЕ**

**диссертации Абишова Абдикалыка Абдижаппаровича на тему: «Профилактика и диагностика ящура парнокопытных животных» на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**Ключевые слова:** ящур, серотипы А, О и Азия-1, антиген, антитела, иммунитет, сыворотка, вакцина, иммунизация, адъювант, вирулентность.

**Объекты исследования:** сельскохозяйственные и лабораторные животные, штаммы возбудителя ящура типов А, О и Азия-1, выделенные и идентифицированные на территории Республики Казахстан.

**Предмет исследования:** штаммы возбудителя ящура типов А, О и Азия-1, антигены, антитела, адъюванты, клеточные культуры.

**Цель исследований:** изучение иммунобиологических свойств полевых штаммов вируса ящура, выделенных на территории Республики Казахстан и на их основе разработка технологии изготовления диагностических и профилактических препаратов.

**Материалы и методы исследования:** полевые и лабораторные штаммы вируса ящура, клинические, патологоанатомические, вирусологические, серологические, микробиологические и эпизоотологические методы исследования.

**Результаты исследований:** методами вирусологических и серологических исследований выделен и идентифицирован полевой штамм вируса ящура типа Азия-1, изучены иммунобиологические свойства полевых и лабораторных штаммов типов А, О и Азия-1 разработаны параметры получения биологической массы вируса; разработана технология изготовления типоспецифических антигенов и штаммоспецифических сывороток типов А, О и Азия-1 для диагностики и типизации ящура в серологических реакциях. Усовершенствована технология изготовления инактивированной трехвалентной культуральной универсальной вакцины против ящура парнокопытных животных на основе местных изолятов возбудителя инфекции.

**Новизна исследований** состоит в получении штаммов вируса ящура типов А, О и Азия-1 разработке технологии изготовления антигенов, сывороток и трехвалентной универсальной культуральной инактивированной вакцины против ящура типов А, О, Азия-1.

**Степень использования:** на новые разработки представлены нормативные документы по изготовлению, контролю и применению антигенов, специфических сывороток и трехвалентной вакцины против ящура.

**Область применения:** ветеринарная практика и ветеринарные диагностические лаборатории.

**SUMMARY**

**Abishov Abdikalyk Abdizhapparovich dissertation on the theme: "Prevention and diagnosis of foot and mouth disease of cloven-hoofed animals" for the degree of doctor of veterinary sciences, specialty 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology and immunology with mycotoxicology**

**Keywords**: FMD serotypes A, O and Asia-1 antigen, antibody immunity, serum, vaccine, immunization, adjuvant virulence.

**Objects of research:** farm and laboratory animals, strains of FMD types A, O and Asia-1, isolated and identified on the territory of the Republic of Kazakhstan.

**Subject of study:** strains of FMD types A, O and Asia-1 antigens, antibodies, adjuvants, cell cultures.

**The purpose of research:** to study the immunobiological properties of field strains of the FMD virus, isolated in the territory of the Republic of Kazakhstan and, based on the development of manufacturing technology of diagnostic and preventive medications.

**Materials and methods:** field and laboratory strains of FMD virus, clinical, pathological, virological, serological, microbiological and epizootological methods.

**Research results:** methods of virological and serological studies isolated and identified the field strain of FMD virus type Asia-1, studied immunobiological properties of field and laboratory strains of types A, O and Asia-1 developed parameters for obtaining the biomass of the virus; the technology of manufacturing strain-type-specific antigens and serum types A, O and Asia-1 for the diagnosis and typing of FMD serological tests. The technology of production of inactivated trivalent culture universal vaccine against FMD cloven-hoofed animals on the basis of local isolates of the pathogen infection.

**The novelty of the research** is to obtain strains of FMD virus types A, O and Asia-1 design technology of antigens, serums and universal culture trivalent inactivated vaccine against FMD types A, O, Asia 1.

**Extent of use:** new developments presented regulations on the production, control and application of antigens, serums and specific trivalent vaccine against foot and mouth disease.

**Application area:** veterinary practices and veterinary diagnostic laboratories.

**Абишов Абдикалык Абдижаппарович**

**ПРОФИЛАКТИКА И ДИАГНОСТИКА**

**ЯЩУРА ПАРНОКОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Объем 2,62 уч.изд.л.

Тираж 100 экз. Заказ № \_\_\_\_

Типография ОсОО «Алтын Принт»

720000, г. Бишкек, ул. Орозбекова, 44

Тел.: (+996 312) 62-13-10

e-mail: altyntamga@mail.ru