

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ  
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)  
ФГБУ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ  
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

# ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

МАЙ №1 (1) 2012







## СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

### Ветеринария сегодня Двужызычный научный журнал №1(1) 2012

**Главный редактор:** Василий Александрович Грубый, доктор экономических наук, профессор, академик РАЕН, директор ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Шеф-редактор:** Анна Глаголева

**Выпускающий редактор:** Ольга Борисова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова  
**e-mail:** [veterinarytoday@yandex.ru](mailto:veterinarytoday@yandex.ru)  
**(495) 744 01 52**

#### Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

– **А.А. Гусев** – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАСХН, директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (г. Минск, Беларусь);

– **А.Р. Сансызбай** – доктор ветеринарных наук, профессор, генеральный директор Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (п.г.т. Гвардейский, Казахстан);

– **В.В. Дрыгин** – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ» – заместитель главного редактора;

– **О.А. Борисова** – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ» - выпускающий редактор;

– **К.Н. Груздев** – доктор биологических наук, член-корреспондент РАЕН, главный эксперт по болезням свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **В.В. Макаров** – доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой ветеринарной патологии РУДН (г. Москва);

– **В.А. Мищенко** – доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **В.С. Русалеев** – доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **О.В. Прунтова** – доктор биологических наук, профессор, гл. эксперт по пищевой безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **В.Н. Ирза** – доктор ветеринарных наук, зав. лабораторией эпизоотологии и мониторинга ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **С.К. Старов** – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **А.С. Иголкин** – кандидат ветеринарных наук, зав. аспирантурой ФГБУ «ВНИИЗЖ»;

– **Л.Б. Прохвятилова** – кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Дизайн и верстка:** Олеся Михайлина

**Корректор:** Анастасия Перекрестова

**Менеджер по подписке и дистрибуции:** Алексей Липатов +7 (925) 357 20 61

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № ФС77-47033 от 21 марта 2012 г. Тираж 550 экземпляров. Бесплатно.

**Учредитель:** ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Издатель:** ООО «Успех-МЕДИА» (105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д.13, оф. 402)

**Адрес редакции:** 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Типография:** ЗАО «Группа-Море», г. Москва, Хохловский переулок, д.7-9, тел.: (495) 917-42-28

**5** В.В. Макаров  
**Гирусы. Сравнительная таксономия вируса Африканской чумы свиней в группе крупных ядерно-цитоплазматических дезоксирибовирусов.**

**5** V.V. Makarov  
**Giruses. Comparative taxonomy of the African swine fever virus.**

**9** Д.В. Михалишин, М.Н. Гусева, В.Д. Юрчишин  
**Исследование роста клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура в средах на основе heres-буфера.**

**12** D.V. Mikhailishin, M.N. Guseva, V.D. Yurchishin  
**Study of growth of BHK-21/2-17 cells and FMDV (Foot and mouth disease virus) replication in media on the basis of HEPES-buffer.**

**15** А.А. Гусев, П.А. Красочко  
**Пути обеспечения эпизоотического благополучия свиноводства в Республике Беларусь.**

**19** A.A. Gusev, P.A. Krasochko  
**Pathways for provision of freedom from porcine diseases in the Republic of Belarus.**

**23** Е.А. Чичерина, М.И. Шульпин  
**Локализация аттенуированного и вирулентного штаммов вируса болезни Марека серотипа 1 в организме цыплят.**

**26** Ye.A. Chicherina, M.I. Shulpin  
**Localization of Attenuated and Virulent Serotype 1 strains of Marek's Disease Virus in Chickens.**

**29** И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, И.А. Чвала, А.В. Андриясов, А.С. Иголкин  
**Парамиксовирус птиц серотипа 1 в популяции диких птиц на территории озера Тагарское Красноярского края в 2011г.**

**33** I.P. Pchelkina, S.N. Kolosov, I.A. Chvala, A.V. Andryasov, A.S. Igolkin  
**Avian paramyxovirus serotype-1 in wild bird population in the territory of Lake Tagarskoe, Krasnoyarsk Krai, in 2011.**

**37** Н.С. Бардина, О.Н. Петрова, А.В. Саввин  
**Роль диких кабанов в эпизоотическом процессе АЧС.**

**40** N.S. Bardina, O.N. Petrova, A.V. Savvin  
**The role of wild boars in the ASF epidemic process in the Russian Federation.**

**43** Н.Б. Шадрова  
**О результатах микробиологического исследования пищевых продуктов.**

**46** N.B. Shadrova  
**Results of microbiological testing of food products.**

**49** С.А. Похвальный, В.Ю. Кулаков  
**Регламентирование технологических характеристик эмбрион-вакцины против оспы птиц из штамма «КЭМ-7» с разбавителем.**

**52** S.A. Pokhvalny, V.Yu. Kulakov  
**Regulation of technological characteristics of fowlpox "KEM-7" strain-based embryo vaccine with diluent.**

**55** А.А. Шевцов, В.Л. Гаврилова, О.Ю. Горюшев, К.Н. Груздев  
**Современная эпизоотическая ситуация по КЧС в России.**

**57** A.A. Shevtsov, V.L. Gavrilova, O.Yu. Goryushev, K.N. Gruzdev  
**Current CSF epidemic situation in Russia.**



# УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

ВНИИЗЖ был образован в 1958 г. и до 1992 г. назывался Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИИЯИ). Конечно, за эти годы многое в Институте, начиная с названия, изменилось: увеличилось количество научно-исследовательских лабораторий, открылись новые направления научных исследований, осуществляется эпизоотологический мониторинг с последующими прогнозами и ликвидацией эпидемий. Ученые нашего центра участвуют в лечебно-профилактических мероприятиях практически во всех странах мира, поддерживают тесные связи с ведущими ветеринарными центрами Великобритании, Франции, Польши, Финляндии, США, Германии и стран СНГ.

Сегодня ФГБУ «ВНИИЗЖ» является одним из ведущих научных учреждений в области ветеринарной инфекционной патологии, пользуется заслуженной научной репутацией не только в России, но и в мире, более 50 лет. За выдающиеся заслуги в развитии сельского хозяйства Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) присвоила Институту два международных статуса: «Региональной референтной лаборатории МЭБ по ящуру» (1995 год), «Центра МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья» (1997 год).

В Центре трудится около 1000 высококвалифицированных специалистов, среди которых 20 докторов наук, 112 кандидатов наук. Большая роль в решении возложенных на коллектив задач отводится молодым ученым, способным проводить исследования на уровне новейших научных достижений, владеть соответствующей информацией и методиками по разработке конкурентоспособных технологий на рынке диагностических и вакцинных препаратов.

Ежегодно сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ» стажировались и проходят повышение квалификации в профильных лабораториях и университетах всего мира, уделяют значительное внима-

ние практической направленности исследований, постоянно совершенствуют технологии изготовления ветеринарных препаратов, осуществляют их экспериментальное и опытно-промышленное производство, оказывают практическую помощь животноводческим хозяйствам в организации противоэпизоотических профилактических мероприятий.

Большое значение отводится мониторинговому исследованию, слежению за эпизоотической ситуацией по болезням животных в мире, для чего в Институте создан Информационно-аналитический центр, собирающий информацию буквально по крупницам со всего мира. Все данные обрабатываются и поступают в центральные органы управления – Россельхознадзор и Министерство сельского хозяйства.

За разработку научных основ и комплекса мероприятий, обеспечивающих ликвидацию эпизоотий болезней животных, научные сотрудники неоднократно отмечались Государственными премиями в области науки и техники.

Исследовательская работа осуществляется в тесном сотрудничестве с научными учреждениями зарубежных стран, максимально открыта для международного ветеринарного сообщества, о чем свидетельствуют многочисленные совместно прорабатываемые научные программы и мероприятия, открытость для посещения научных лабораторий иностранными специалистами, публикации результатов исследований как в отечественных, так и в зарубежных изданиях.

Наш Центр располагает широчайшими возможностями. Подробнее о них Вы можете узнать также на нашем сайте [arria.ru](http://arria.ru).

*Директор ФГБУ «ВНИИЗЖ»,  
доктор экономических наук, профессор  
Василий Александрович Грубый.*

# ГИРУСЫ (СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТАКСОНОМИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ГРУППЕ КРУПНЫХ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ДЕЗОКСИРИБОВИРУСОВ)

**Makarov V.V.**

**В.В.Макаров**, доктор биологических наук, профессор  
Российского университета дружбы народов

## SUMMARY

The new discoveries and conceptions in virology, in part, virospher and giruses as large nuclear cytoplasmic DNA genomic viruses are summered briefly. The main taxonomic features and pathogenicity of the viruses including African swine fever virus are interpreted in context of the new considerations.

**Key words:** virospher, giruses, large nuclear cytoplasmic DNA genomic viruses, ecology, taxonomy, African swine fever virus.

## РЕЗЮМЕ

Кратко обобщены новые открытия и концепции в области вирусологии, в частности, относительно виросферы и гирусов – группы крупных ядерно-цитоплазматических дезоксирибовирусов. В контексте новых представлений интерпретируются важнейшие таксономические признаки и патогенность вирусов, в том числе африканской чумы свиней.

**Ключевые слова:** виросфера, гирусы, крупные ядерно-цитоплазматические ДНК-содержащие вирусы, экология, таксономия, вирус африканской чумы свиней.

К концу 20 века вирусология в строгом значении, после столетия успешного развития, существенно деградировала по ряду объективных причин. Прежде всего, поле ее деятельности в фундаментальном и идеологическом отношении, определяющих самостоятельность любой «уважаемой» науки, оказалось исчерпанным (прионы, открытие которых в 1984 году оценено позднее Нобелевской премией, вряд ли можно полностью отнести к компетенции вирусологии). Вторая причина – бурное развитие новых наук и направлений типа технологии рекомбинантных ДНК, геномики, биотехнологии в целом, вследствие которого размыты самостоятельность и своеобразие вирусологии в строгом значении; поистине революционизирующие инновации типа иммуноферментного, геномного анализа, ПЦР также имеют к вирусологии лишь частное отношение. Наконец, третья причина, для отечественной науки наиболее характерная, – прессинг прагматизма, отмечающий все, что не в интересах пресловутого выживания. Однако вирусология – наука не о болезнях, причиной которых служат вирусы, не о диагностикумах, «препаратах» и «вакцинах».

## ВИРОСФЕРА

Начало новым представлениям о вирусах положено недавно опубликованными сообщениями об обнаружении сотен тысяч новых вирусов в такой своеобразной и мало исследованной части Света, как Мировой океан. Например, наиболее многочисленная вирусная фауна у западного побережья Канады насчитывала 129 000 различных вирусных генотипов.

Основой открытия послужило широкомасштабное применение метагеномного анализа, суть которого заключалась в изучении ДНК, тотально выделенной из фильтратов морской воды. Оказалось, что последовательности подавляющего большинства полученных геномных образцов неизвестны науке и отсутствуют в мировых базах данных. Морской вирусный метагеном (или виром) представляли преимущественно неизвестные ДНК-содержащие вирусы, главным образом, сине-зеленой водоросли *Prochlorococcus*, основного элемента фотосинтеза на Земле. При этом плотность вирусного населения в поверхностных слоях океана, по-видимому, измеряется сотнями миллионов вирусных частиц в литре воды [3].

Следовательно, вирусы оказываются самой многочисленной формой жизни на Земле, полноправно образующей специфическую общность живой материи самостоятельного типа, определяемого как виросфера: их расчетная суммарная численность может достигать  $4 \times 10^{30}$  частиц. По иному представляется роль вирусов в биосфере, в планетарном круговороте генов, вещества, энергии, в экономике природы в целом. Они обуславливают необыкновенное буйство жизни, по меньшей мере, в важной, если не важнейшей части планеты – Мировом океане, первичном источнике живой материи. В этих условиях детрит – продукты разрушения вирусами одноклеточных организмов, составляющих планктон, обеспечивает свыше трети органических ресурсов в водных экосистемах; формируется обходной, упрощающий и ускоряющий жизненные процессы «вирусный



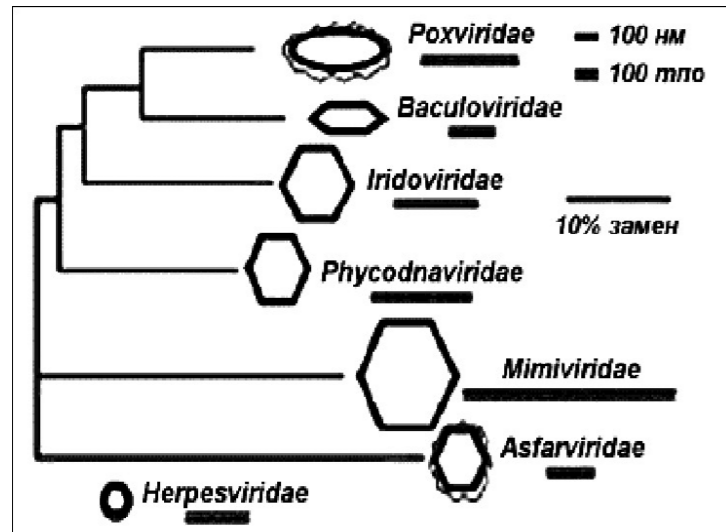


Рисунок 1. Филогенетическое древо и сравнительная таксономия гирусов: структурный тип капсида, размеры частиц (нм) и ДНК (Mbp – тысяч пар оснований), степень генетической близости (% замен). Для поксвирусов и вируса АЧС показано наличие суперкапсидной оболочки [по <http://elementy.ru/>]. В правом верхнем углу приведены масштабы для сравнения размеров капсидов и геномов; длины ветвей древа соответствуют количеству замен в геноме.

Таблица. Основные характеристики гирусов и прокариот [по 5]

Организм	Размер организма, нм	Размер генома, тпо*	Преимущественные хозяева и восприимчивые группы
E.coli	400-800 x 1000-3000	4600-5600	Позвоночные
Mimivirus	400-800	1 200	Свободно живущие одноклеточные
Rickettsia	200-600 x 400-2000	1 100	Позвоночные, членистоногие
Chlamydia	250-1500	1 100	Позвоночные
Treponema	100-180 x 6000-20000	900-1 100	Позвоночные
Mycoplasma	125-300	600-950	Позвоночные
Phycodnaviruses	190-600	150-560	Фитопланктон
Poxviruses	200-400	130-350	Позвоночные
Iridoviruses	130-170	150-280	Насекомые, амфибии, рыбы
Asfarvirus	175-215	170-190	Suidae, Argasidae
Herpesviruses	120-300	150-160	Позвоночные

\* На один ген приходится в среднем около 1 тпо

шунт», дающий суммарный годичный выход углерода в ~ 0.5 гигатонн [9].

Полученные при исследовании новых элементов вирусологии данные фактически ликвидировали остаточную грань между вирусами и живыми организмами в каноническом понимании. Выдвинута гипотеза относительно роли вирогенеза в образовании клеточных форм жизни: структура и биохимия вновь открытых самых крупных мимивирусов имеет много общего с ядром эукариот и указывает на возможный вирусный эукариогенез по аналогии с вектором эндосимбиотического происхождения других важнейших клеточных органелл, в частности, «морские свободно живущие альфа-протеобактерии → митохондрии», «цианобактерии → хлоропласты грибов и растений» [4, 5].

Исходя из концепции виросферы, сформулирован новый принцип деления организмов на две основные группы – рибосомальные (бактерии, археи, эукариоты) и капсидные (вирусы), а для других самовоспроизводящихся структур предложено название сиротские репликоны (вириды, плазмиды) [14, 17].

### МИМИВИРУСЫ

В числе прочих в океаническом метагеноме оказались последовательности ДНК эмерджентных вирусов необычно крупных размеров и состава. Они получили название мимивирусов из-за сходства (мимикрии) с обнаруженным еще в 1992 году хорошо видимым в световом микроскопе коккоподобным микроорганизмом - внутриклеточным паразитом акантамеб (*Acanthamoeba polyrhaga*), обитающим в воде местных градиен, принятым за этиологический агент локальной вспышки пневмонии водного происхождения (типа легионеллеза) в Бредфорде (Великобритания). Впоследствии, в 2003 году, именно этот микроорганизм охарактеризован как мимивирус [11].

Новый вирус имел структурные характеристики, существенно превосходящие таковые многих канонических представителей царства *Vira* и даже некоторых прокариот (см. таблицу): размеры 750 нм, икосаэдральный белковый капсид размером 400 нм, покрытый фибриллами длиной 80 нм (см. рисунок 2), геном около 1200 тпо, кодирующий более 900 полипептидов, многие из которых не имеют аналогов среди известных вирусов. В частности, кодируются четыре аминоксил-тРНК-синтетазы – центральные компоненты аппарата трансляции [8, 14, 17].

В дальнейшем анализ метагеномов в окружающей среде показал, что нуклеотидные последовательности, сходные с генами мимивирусов, содержатся повсеместно, где обитает их хозяин-акантамеба – в воде, почве, выделяются из воздуха. В виду сходства с таковыми упомянутых выше представителей океанической вирофауны потенциальным хозяином мимивирусов могут быть одноклеточные водоросли, кораллы, губки. На этом основании выделяемые из разных источников гигантские вирусы составили семейство *Mimiviridae*, у членов которого оказалось много общего с крупными дезоксирибовирусами: набор генов, вирусных ферментов, репродукция в цитоплазме и ядре чувствительной клетки, икосаэдральное строение капсида. Поскольку гигантские вирусы, родственные мимивирусу, широко распространены в Мировом океане, они также могут играть важную роль в глобальных геохимических круговоротах [8, 17].

### ГРУППА КРУПНЫХ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ДЕЗОКСИРИБОВИРУСОВ

С открытием мимивирусов во многом изменились представления в общей и частной вирусологии. Несмотря на уникальную общность царства *Vira*, из него явно выделяется по строению, физиологии и другим характеристикам своеобразная совокупность, включающая членов по меньшей мере пяти семейств – кроме *Mimiviridae* это *Phycodna*-, *Irido*-, *Asfar*- и *Poxviridae* (таблица 1). Этот комплекс крупных ядерно-цитоплазматических дезоксирибовирусов, инфицирующих представителей разных таксономических групп, от свободно живущих одноклеточных гетеротрофов и фитопланктона до млекопитающих, получил акронимическое название гирусы (гигантские + вирусы) [6].

Гипотетически общий филогенез гирусов представляет регрессивную эволюцию от более сложных прокариотических организмов – микоплазм, риккетсий, хламидий. Для их геномов характерно большое количество гомологичных копий (дубликаций) одних и тех же последовательностей и избыточных генов, функционально дублирующих клеточные, оставшихся от периода автономного существования. Составы и комбинации в геномах собственных и хозяйских последовательностей могут указывать на их конкретного гипотетического предка. В структуре отдельных гирусов также много белков, гомологичных другим представителям группы, что говорит об их общем происхождении. Предполагается, что необычная величина геномов гирусов объясняется особенностями экологических ниш, накладывающих меньшие ограничения на размеры генома [6, 17].

Все это дает основание некоторым исследователям считать, что гирусы являются новым, четвертым доменом жизни наряду с бактериями, археями и эукариотами [5].

### КАПСИДЫ ГИРУСОВ

За исключением поксвирусов, все гирусы имеют икосаэдральную симметрию капсидов. По-видимому, икосаэдральный принцип пространственной организации биологических структур как хранилищ генетического материала с многокомпонентной профилированной триангуляционной укладкой 1500-2000 и более составляющих с точки зрения экономики природы наиболее рационален, т.к. по физическим качествам обладает сравнительно высокой стерической, конфигурационной, «угловой» жесткостью по аналогии с упорядоченной жесткостью кристаллических решеток в физической химии. Не исключается, что в эволюции икосаэдральных капсидных организмов существенная роль принадлежит экологической нише в виде популяций свободно живущих одноклеточных гетеротрофов, включая системы «вирус АЧС-макрофаги» и «иридовирусы полиэдрозов-гемоциты беспозвоночных», где устойчивость ко всякого рода инактивирующим воздействиям и сохраняемость в заведомо неблагоприятных условиях являются экологически востребованными.

Также важным обобщающим признаком гирусов является отсутствие какой-либо структурно-функциональной роли в составе вирусов и вообще необязательности суперкапсидной оболочки; лишённые ее вирусы АЧС и оспы остаются инфекционными [2].

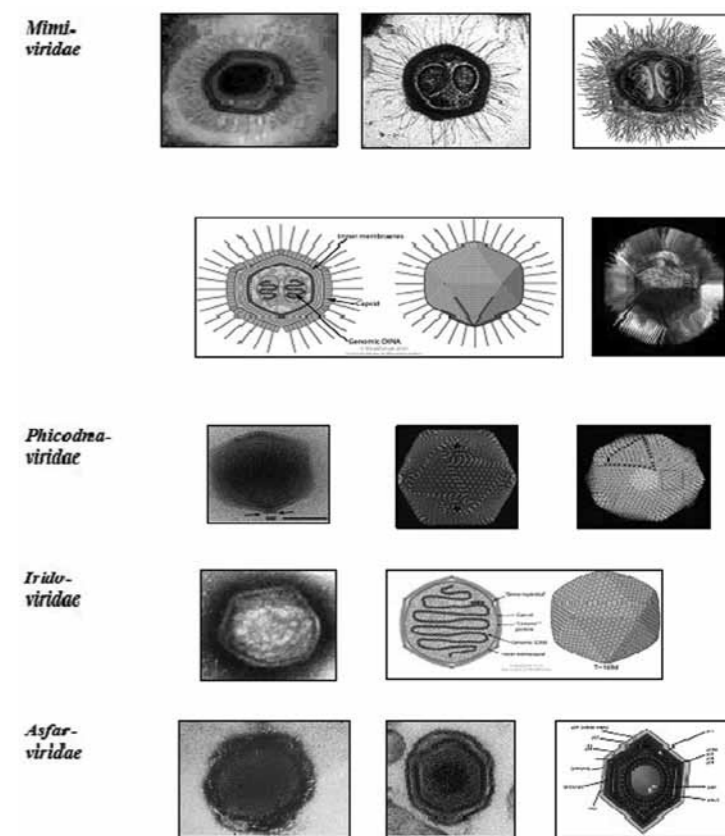


Рисунок 2. Капсиды икосаэдральных дезоксирибовирусов [no images.yandex.ru].

### ЭНДОЦИТОЗ И ПАТОГЕННОСТЬ ГИРОВИРУСОВ

Взаимоотношения гировирусов с чувствительными клетками в виду хозяйинного многообразия различны. Иридовирусы-возбудители полиэдрозов беспозвоночных проникают в клетки путем свободного пиноцитоза, поксвирусы содержат «раздевающий фермент», облегчающий процесс интернализации, фикодрнавирусы также используют собственный ферментативный аппарат слияния частиц с относительно прочной мембраной одноклеточных водорослей и проникновения по типу фаговой инфекции бактерий. Однако наиболее важным представляется тривиальное рецепторнезависимое поглощение крупных частиц мимивирусов свободно живущими одноклеточными гетеротрофами с фагоцитарным типом питания и внутриклеточного пищеварения и вируса АЧС – макрофагами, которые в условиях организмахозяина в качестве эндосимбионтов ведут аналогичный свободный образ жизни, поведения, питания, сходный с одноклеточной фауной.

Этот тип взаимоотношений с клетками мимивирусов, с учетом их размерного соответствия требованиям свободного фагоцитоза (от 200 нм) и устойчивости икосаэдральных капсидов к переваривающим механизмам фагоцитов, а priori открывает «перспективы» приобретения патогенности для теплокровных животных. Реальный вектор – переход от паразитирования в свободно живущих одноклеточных гетеротрофах к фагоцитирующим одноклеточным комменсалам или клеткам членистоногих и далее к макрофагам животных. Серьезной предпосылкой для реализации такого вектора является экологическая и эпидемиологическая сопряженность хозяев мими-

вирусов с теплокровными животными на примере амёб-комменсалов нескольких видов, которые продолжительно обитают в толстом отделе кишечника млекопитающих (кошки, собаки, приматы, человек) и питаются бактериями; в их числе дизентерийная *Entamoeba histolytica* – возбудитель колитов. Это можно интерпретировать также как тип последовательного гиперпаразитизма в системе «мимивирус → амёбы → теплокровные организмы» по аналогии с бактериями-носителями трансмиссивных генетических факторов патогенности (транспозонов, плазмид, фагов).

Мимивирусы по результатам скрининга на основании серопозитивности уже ассоциируются со вспышками у людей пневмонии, связанной с бытовым водоснабжением по аналогии с легионеллезом. Легочные поражения также воспроизведены в эксперименте заражением мышей [10, 12, 15].

### ВИРОФАГИЯ

При исследовании мимивирусов было открыто уникальное явление – «вирус вируса», т.е. вирофаговая инфекция вирусом, получившим название «спутника». В клетках зараженных мимивирусом амёб и нередко в частицах мимивируса обнаружен относительно мелкий икосаэдральный вирус диаметром 50 нм, паразитирующий на крупном. Вирус-«спутник» использует внутриклеточные мимивирусные компартменты сборки для воспроизводства и размножается значительно быстрее мимивируса-«хозяина» (одно из канонических условий паразитизма). Вирус-«спутник» наносит очевидный и существенный вред, который можно назвать «виropатогенным» действием – патологические изменения мимивируса заключаются в непропорциональном многократном утолщении суперкапсидной оболочки от 40 до 240 нм. «Спутниковая» инфекция подавляет репродукцию мимивируса-«хозяина» на 70% и вдвое снижает смертность в популяции зараженных амёб [7, 13, 16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Вирусологические исследования биосферы последнего десятилетия, их фундаментальные и прикладные результаты становятся новым импульсом для развития этой науки о своеобразной форме жизни, живой материи на одном из исходных этапов ее возникновения и эволюции, объединенной в отдельное царство *Vira*. До этого вирусология ограничивалась преимущественно ее негативными эффектами, исходя из определения, данного Андре Львовым (1957) при формулировке им концепции вирусов как «строго внутриклеточных, потенциально патогенных агентов с инфекционной фазой развития, содержащих нуклеиновую кислоту только одного типа, репродуцирующихся в форме генетического материала, не способных к росту и бинарному делению и лишенных «системы Липмана» (одной из ферментных систем, участвующих в производстве энергии)» [1].

В современном представлении вирусы – это «капсидные организмы, состоящие из белков и нуклеиновых кислот, формирующие нуклеокапсиды путем самосборки, использующие для своего жизненного цикла рибосомальные организмы» [5, 8].

2. Объединяющие характеристики гирусов, в частности, икосаэдральный тип строения (вероятно, преимущественный признак нового домена жизни по аналогии с такими, как ядро или липидный бислой биомембраны эукариотов) и неструктурный характер

мембранных протективных антигенов (гемадсорбирующие антигены и гемагглютинины) проливают свет на экстраординарные свойства относящихся к этой категории важнейших с точки зрения реальной патологии вируса АЧС и поксвирусов – высокую устойчивость и отсутствие гуморальной защиты, и а priori определяют их.

3. Гирусы, особенно члены семейства *Mimiviridae*, представляют потенциальный источник происхождения эмерджентных патогенов. В эпизоотологии и эпидемиологии универсальны ситуации переходов паразитов на новых хозяев с формированием новых паразитарных систем и возникновением новых болезней на последних этапах их филогенеза как одного из ведущих факторов эмерджентности. Реальным примером вероятного «освоения» эукариотического мира могут служить данные о роли мимивируса в респираторной патологии.

В этом отношении вирус АЧС, согласно гипотезе «клеточной первичности» его происхождения [2], может рассматриваться как «первопроходец».

4. Чрезвычайный интерес для фундаментальной и, возможно, прикладной вирусологии представляет открытие вирофагии, гиперпаразитов и естественных «врагов» вирусов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Лурия С., Дарнелл Дж. Общая вирусология. Пер. с англ. 1970. -М., 424 с.
2. Макаров В.В. Африканская чума свиней. – М., 2011. 269 с.
3. Angly F. et al. The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biol.* 2006, 4(11), 2121-2131.
4. Bell P. The viral eukaryogenesis hypothesis: a key role for viruses in the emergence of eukaryotes from a prokaryotic world environment. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009, 1178, 91-105.
5. Claverie J.-M. Viruses take center stage in cellular evolution. *Genome Biol.*, 2006, 7, 110.
6. Claverie J.-M. et al. Mimivirus and the emerging concept of «giant» virus. *Virus Research*, 2006, 117, 1, 133-144.
7. Claverie J.-M. and Aberger C. Mimivirus and its virophage. *Ann. Rev. Genetics*, 2009, 43, 49-66.
8. Claverie J.-M. et al. Mimivirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2009, 328, 89-121.
9. Donovaro R. et al. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature*, 2008, 454, 1084-1087.
10. Khan M. et al. Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *Microb. Pathog.*, 2007, 42 (2-3), 56-61.
11. La Scola B. et al. A giant virus in amoebae. *Science*, 2003, 299, 2033.
12. La Scola B. et al. Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 3, 449-52.
13. La Scola B. et al. A virophage is a unique parasite of the giant Mimivirus. *Nature*, 2008, 455, 100-105.
14. Raoult et al. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 2004, 306 (5700), 1344-1350.
15. Raoult D. et al. The discovery and characterization of mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clin. Inf. Dis.-Emerg. Inf.*, 2007, 45, 95-102.
16. Sun S. et al. Structural studies of the Sputnik virophage. *J. Virol.*, 2010, 84 (2), 894-897.
17. Suzan-Monti M. et al. Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. *Virus Res.*, 2006, 117 (1), 145-55.

УДК 619:578.835.2:57.082.26

# ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК ВНК-21/2-17 И РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА В СРЕДАХ НА ОСНОВЕ НЕПЕС-БУФЕРА

Д.В. Михалишин<sup>1</sup>, М.Н. Гусева<sup>2</sup>, В.Д. Юрчишин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

### РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты исследования роста клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура в средах, содержащих НЕПЕС и фосфатно-бикарбонатный буфер.

**Ключевые слова:** НЕПЕС, фосфатно-бикарбонатный буфер, клетки ВНК-21/2-17, вирус ящура.

### ВВЕДЕНИЕ

Основу питательных сред составляют солевые растворы. Минеральные компоненты в этих растворах подобраны так, что раствор выполняет буферные функции, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования.

В качестве буферной системы чаще всего используют фосфатно-бикарбонатные буферы, однако они требуют насыщения среды углекислотой и последующего культивирования в герметически закрытых сосудах или инкубации культур в термостатах с атмосферой, содержащей регулируемые количества CO<sub>2</sub>.

Этих трудностей можно избежать, если использовать буферы на основе фосфатов или, что более перспективно, замещенных сульфоновых кислот: – 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинтан-сульфоновой (НЕПЕС).

Предполагают, что НЕПЕС влияет на функционирование клеток [1]. Так, минимальное количество, оказывающее токсическое действие (изменение клеточных мембран, изменение гликопротеинового синтеза), составляет 30-40 мМ.

НЕПЕС легко растворим в воде, не связывает двухвалентные катионы, не токсичен до концентрации 0,05 Моль. Применяется в концентрации 0,01-0,03 Моль [3].

В последнее время НЕПЕС все чаще используется для изготовления питательных сред [2; 4]. Его использование обусловлено необходимостью сохранения pH в нужных для производства границах [4].

В задачу наших исследований входило сравнение роста клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура в средах, содержащих НЕПЕС- и фосфатно-бикарбонатный буфер.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали питательную среду (опытную) для выращивания клеток ВНК-21/2-17, содержащую в своем составе 15мМ НЕПЕС, имеющую pH 6,65 и осмотическое давление 327 мОсм.

В качестве контроля брали стандартную питательную среду для выращивания клеток, изготовленную согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов», имеющую pH 7,2 и осмотическое давление 355 мОсм.

Для репродукции вируса ящура были изготовлены среды:

– 1а, питательная среда для репродукции вируса, содержащая 15мМ НЕПЕС, имеющая pH 7,3 и осмотическое давление 409 мОсм (опыт);

– 2а, питательная среда для репродукции вируса на основе фосфатно-бикарбонатного буфера, имеющая pH 7,5 и осмотическое давление 392 мОсм (контроль)

Культивирование проводили в стеклянном ферментере объемом среды до 30 дм<sup>3</sup>.



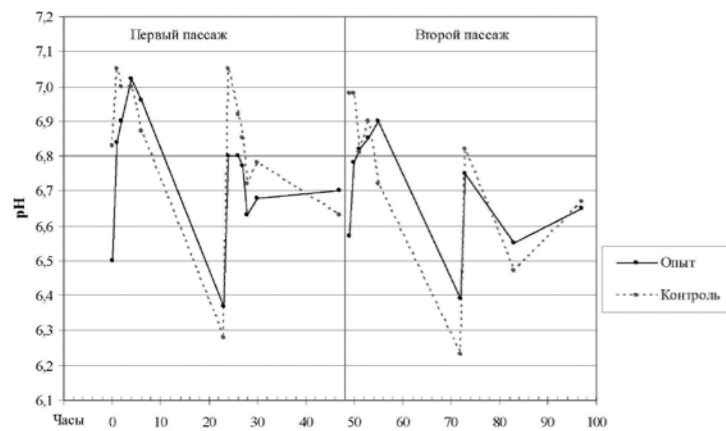


Рис. 1. Динамика изменения pH при культивировании клеток ВНК-21/2-17 в различных средах.

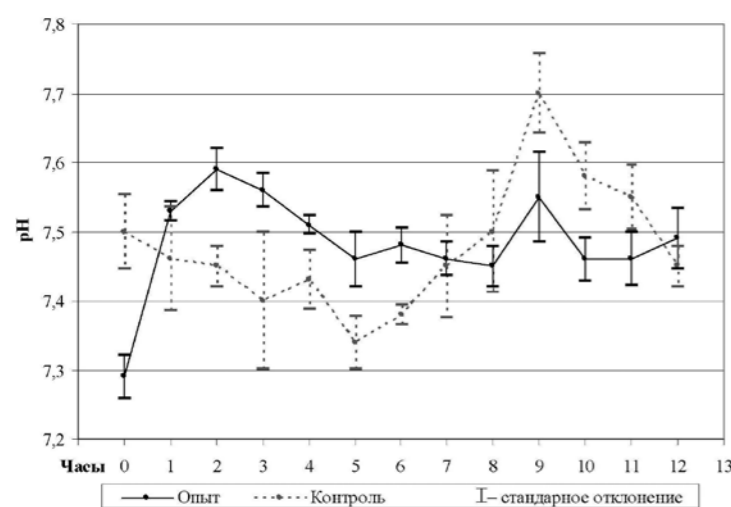


Рис. 2. Динамика изменения pH при репродукции вируса ящура в различных средах.

В качестве закрытой системы для исследования динамики изменения pH при выращивании клеток и получения вируса ящура использовали соответственно Incubations schüttelschrank BS 4 (шейкер) и клинские матрасы.

Опыты по получению урожая вируса в клинских матрасах проводили в перевиваемой культуре клеток свиного происхождения ПСГК-30, при этом использовали среды:

- среда, содержащая 15мМ НЕРЕС, имеющая pH 7,3 и осмотическое давление 409 мОсм;
- (контрольная) – среда ИГЛА для репродукции вируса на основе фосфатно-бикарбонатного буфера, имеющая pH 7,3 и осмотическое давление 326мОсм.

В работе использовали такие культуры клеток, как ВНК-21/2-17, ПСГК-30; вирус ящура, штамм «А №2045/Киргизия/2007».

Количество общего вирусного белка и компонентный состав устанавливали согласно «Методике определения содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК», утвержденной директором ВНИИ в 1987 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток ВНК-21/2-17 проводили в стеклянных культиваторах объемом до 30 дм<sup>3</sup> в опытных и контрольных средах. Необходимый кислотно-щелочной баланс поддерживался одинаковым в обеих средах (рис.1). Индекс пролиферации клеток был (при n=6) 4,68±0,647 в опытной среде и 4,67±0,739 в контрольной. Для поддержания нужного pH в опытной среде расход воздуха составил 2,4±1,2 л/ч - 101±4,6 л/ч, в то время как в контрольной – 8,18±2,989 - 101±4,6 л/ч. При увеличении количества суспензии клеток с 10 до 30 дм<sup>3</sup> для поддержания необходимого pH уже дополнительно использовали бикарбонат натрия. Расход его был от 83,3±16,667 до 140±30,55 см<sup>3</sup> и в контроле, и в опыте. Таким образом, не наблюдали существенных различий в параметрах при выращивании клеток в средах на основе различных буферов.

При исследовании суспензии клеток на разных средах в Incubations schüttelschrank BS 4 (шейкере) была замечена разница. Так, первоначальное pH в опытной среде было 7,37±0,044, а через 17 часов стало 6,9±0,058 (при n=3); в контрольной среде, соответственно, было 7,4±0,161 и стало 6,63±0,060, при концентрации клеток

2,7–2,9 млн/см<sup>3</sup>. Таким образом, в среде, содержащей НЕРЕС, pH снижался примерно на 0,47 единиц, а в среде на основе фосфатно-бикарбонатного буфера – на 0,77.

На следующем этапе исследований было изготовлено еще 2 среды на различных буферах для репродукции вируса ящура:

- среда 1а (опытная), содержащая 15мМ НЕРЕС, имеющая pH 7,3 и осмотическое давление 409 мОсм;
- среда 2а (контрольная), на основе фосфатно-бикарбонатного буфера, имеющая pH 7,5 и осмотическое давление 392 мОсм.

Результаты опытов представлены на рис. 2. и рис. 3. Репродукцию вируса проводили также в стеклянных культиваторах с объемом суспензии 10 дм<sup>3</sup>. Колебания pH в опытной среде были существенно меньше по сравнению с контрольной средой, при этом расход воздуха был минимален и составлял 3-5 л/час, расход воздуха в контрольной среде был гораздо выше и доходил иногда до 70 л/ч, что больше в 14-23 раза. Таким образом, среда на основе НЕРЕС хорошо сохраняла буферную емкость при репродукции вируса ящура в границах pH 7,3-7,6.

При исследовании урожая вируса, полученного в двух разных средах, значительных различий так же не выявили (табл. 1). Процент поражения клеток был примерно 90% через 12 часов после заражения, при этом количество вирусспецифического белка было 0,63-0,64 мкг/см<sup>3</sup> с 1 млн. клеток.

При исследовании репродукции вируса ящура в клинских матрасах в монослойной культуре клеток ПСГК-30 существенные различия были выявлены в количестве полученного вирусспецифического белка. Так, в среде на основе НЕРЕС получили 0,56±0,049 мкг/см<sup>3</sup>, а в контрольной – 0,31±0,045 мкг/см<sup>3</sup> (при n=3), что существенно ниже (p<0,05). Водородный показатель сохранялся в течение 18 ч в пределах 7,15-7,45 в опыте и 7,2-7,35 в контроле. Титр инфекционности вируса был 7,33±0,167 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Таким образом, при достаточно стабильном кислотно-щелочном балансе в обеих средах количество полученного вирусспецифического белка было выше

в опытной среде при репродукции вируса в клинских матрасах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установили, что при культивировании клеток ВНК-21/2-17 в стеклянных культиваторах объемом до 30 дм<sup>3</sup>, индекс пролиферации клеток был одинаковым и в опытной среде, и в контрольной. Для поддержания нужного pH в обеих средах воздуха и бикарбоната натрия расходовалось одинаковое количество.

При сравнении сред на основе различных буферов в Incubations schüttelschrank BS 4 (шейкере) было отмечено, что среда, содержащая НЕРЕС, лучше сохраняла буферную емкость, чем среда на основе фосфатно-бикарбонатного буфера.

При сравнении репродукции вируса ящура в средах на основе двух буферов в стеклянных культиваторах, было отмечено, что колебания pH в опытной среде были существенно меньше по сравнению с контрольной средой, при этом и расход воздуха уменьшался в 14-23 раза по сравнению со средой на основе фосфатно-бикарбонатного буфера. При исследовании урожая вируса, полученного в двух разных средах, существенных различий не выявили.

При репродукции вируса ящура в клинских матрасах были обнаружены существенные различия в количестве полученного вирусспецифического белка. Так, в среде на основе НЕРЕС получили 0,56±0,049 мкг/см<sup>3</sup>, а в контрольной – 0,31±0,045 мкг/см<sup>3</sup> (при n=3).

Таким образом, среда на основе НЕРЕС-буфера лучше сохраняла кислотно-щелочной баланс в границах pH 7,3-7,6 и ее целесообразнее использовать для репродукции вируса ящура.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. Л.П Дьяконова., В.И. Ситькова - М.: Спутник+, 2000.- 400 с.
- Каталымов Л.Л., Мангушева Н.А. Действие углекислого газа на развитие анестезии в нервных

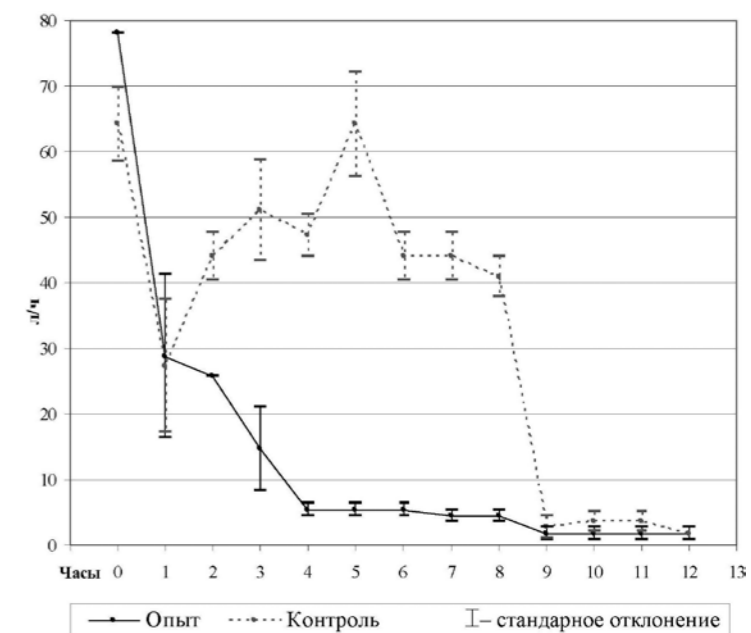


Рис. 3. Динамика изменения потребления воздуха клетками ВНК-21/2-17 при репродукции вируса ящура.

волокна // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6.

– С. 71-72.

3. Наталья Кузьмина. Раздел «Культуры животных клеток и тканей». Культивирование клеток. Питательные среды и условия культивирования // Биотехнология. 1995-2010. - URL: [http://www.biotechnolog.ru/acell/acell1\\_4.htm](http://www.biotechnolog.ru/acell/acell1_4.htm) (дата обращения: 20.02.12).

4. Щелкунова Ю.П., Еремец В.И. Пролиферативная активность постоянной линии клеток SSO-3 из пула внутренних органов сибирского осетра ACIPENSER BAERI в разных условиях культивирования // Ветеринарный врач. – 2010. – № 2. – С. 35-39.

## Влияние состава питательных сред на репродукцию вируса ящура

Среда	Конц. кл, млн/см <sup>3</sup>	Кол-во вирусного белка, мкг/см <sup>3</sup>			% пораж. кл	Время репрод. вируса, ч
		После инакт и очистки	146+75S, (%к общему)	146+75S с 1 млн. клеток		
Опыт	3,00	2,10	1,80 (85,7)	0,72	90	11
	2,72	1,87	1,73 (92,5)	0,64	89	10
	3,40	2,32	1,81 (78,0)*	0,53*	91	12,5
	3,04±0,198	2,09±0,129	1,78±0,025 (85,5±4,188)	0,63±0,055	90±0,577	11,1±0,73
Контр.	2,60	2,10	1,76 (83,8)	0,68	87	11,5
	3,46	2,84	2,48 (87,3)	0,70	90	12
	2,60	1,72	1,37 (79,7)	0,53	96	10,5
	2,89±0,287	2,22±0,329	1,87±0,325 (83,6±2,196)	0,64±0,054	91±2,646	11,3±0,44

\*-только 146S-компоненты

# STUDY OF GROWTH OF BHK-21/2-17 CELLS AND FMDV (FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS) REPLICATION IN MEDIA ON THE BASIS OF HEPES-BUFFER

D.V. Mikhailishin<sup>1</sup>, M.N. Guseva<sup>2</sup>, V.D. Yurchishin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory Head, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", town of Vladimir

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", town of Vladimir

<sup>3</sup> Chief Veterinarian, FGBI "ARRIAH", town of Vladimir

## SUMMARY

The paper presents the study results of growth of BHK-21/2-17 cells and FMDV replication in media containing HEPES and phosphate-bicarbonate buffer.

**Key words:** HEPES, phosphate-bicarbonate buffer, BHK-21/2-17 cells, FMD virus.

## INTRODUCTION

Saline solutions form the basis of nutrient media. Mineral components in these solutions are selected in such a way, that the solution functions as a buffer, maintaining fixed acid-base balance of the medium during cultivation.

Phosphate-bicarbonate buffers are usually used as a buffer system. But they require carbonation of the medium and subsequent cultivation in hermetically sealed vials or culture incubation in thermostats with the atmosphere containing controlled amount of CO<sub>2</sub>.

These difficulties can be avoided if buffers based on phosphates or, what is more promising, on substituted sulfonic acids (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)) are used.

It is supposed that HEPES influences cell functioning [1]. A minimum amount producing toxic effect (change in cell membranes, change in glycoprotein synthesis) is equal to 30-40 mM.

HEPES is readily soluble in water, does not bind bivalent cations, non toxic in concentrations lower than 0.05 M. It is used at a concentration of 0.01-0.03 M [3].

Recently HEPES has been used more frequently for preparation of nutrient media [2, 4]. It is used for maintaining pH within the limits necessary for production [4].

The aim of our study was to compare growth of BHK-21/2-17 cells and FMDV replication in media containing HEPES- and phosphate-bicarbonate buffer.

## MATERIALS AND METHODS

In this study nutrient medium (test) was used for growing BHK-21/2-17 cells. It contained 15 mM HEPES with pH 6.65 and osmotic pressure 327 mOsm.

Standard nutrient medium for cell growing was used as a control. It was produced according to "Manufacturing formulae for production of vaccine against different FMD types" and it had pH 7.2 and osmotic pressure 355 mOsm.

The following media were prepared for FMDV replication:

– 1a, nutrient medium for virus replication, containing 15 mM HEPES, with pH 7.3 and osmotic pressure 409 mOsm (test);

– 2a, nutrient medium for virus replication on the basis of phosphate-bicarbonate buffer, with pH 7.5 and osmotic pressure 392 mOsm (control).

Cultivation was carried out in glass fermentor (volume of medium - up to 30 dm<sup>3</sup>).

Incubations schüttelschrank BS 4 (shaker) and Klin flasks were used as a close system for study of dynamics of pH changes during cell growing and for obtaining of FMDV, correspondingly.

Tests for obtaining virus yields in Klin flasks were conducted in passaged cell culture of porcine origin PSGK-30, using the following media:

– test medium containing 15 mM HEPES, with pH 7.3 and osmotic pressure 409 mOsm;

– control medium – Eagle's medium for virus replication on the basis of phosphate-bicarbonate buffer, with pH 7.3 and osmotic pressure 326 mOsm.

The following cell cultures were used in the study: BHK-21/2-17, PSGK-30; FMD virus, strain "A No. 2045/ Kirgizia/2007".

The amount of total virus protein and the component composition were established according to "Procedure for determination of viral protein content and composition of FMD virus using quantitative complement-fixation test", adopted by the Director of All-Union Foot and Mouth Disease Research Institute in 1987.

## RESULTS AND DISCUSSION

Cultivation of BHK-21/2-17 cells was carried out in glass cultivators (volume - up to 30 dm<sup>3</sup>) in test and control media. Required acid-base balance was maintained at an equal level in both media (Fig. 1). Proliferation index of cells in test medium was equal to 4.68±0.647 (n=6), and in control medium – 4.67±0.739. For maintaining required pH in test medium, air consumption was equal to 2.4±1.2 l/h – 101±4.6 l/h, while in control medium – 8.18±2.989 – 101±4.6 l/h. When the amount of cell suspension was increased from 10 to 30 dm<sup>3</sup>, additional use of sodium bicarbonate was necessary to maintain required pH. Its consumption was from 83.3±16.667 to 140±30.55 cm<sup>3</sup> both in control and test medium. Thus no sufficient differences in parameters were observed during cell growing in media containing different buffers.

The difference was observed during the study of cell suspensions in different media in Incubations schüttelschrank BS 4 (shaker). Initial pH in test medium was 7.37±0.044, and in 17 hours it was 6.9±0.058 (n=3); and in control medium it was 7.4±0.161 and then it was 6.63±0.060, at the cell concentration of 2.7-2.9 mln/cm<sup>3</sup>. Therefore in HEPES-containing medium pH decreased approximately by 0.47 units, and in the medium based on phosphate-bicarbonate buffer – by 0.77 units.

At the next stage of the study 2 more media for FMDV replication were prepared using different buffers:

– 1a medium (test) containing 15 mM HEPES, with pH 7.3 and osmotic pressure 409 mOsm;

– 2a medium (control) based on phosphate-bicarbonate buffer, with pH 7.5 and osmotic pressure 392 mOsm.

The test results are given in Fig.2 and Fig.3. Replication of virus was also carried out in glass cultivators (suspension volume – 10 dm<sup>3</sup>). pH variations in test medium were much less than in the control medium, and air consumption was minimal (3-5 l/h),

whereas air consumption in the control medium was much higher and sometimes reached 70 l/h, what is 14-23 times as much. Thus, HEPES-based medium provided good buffer capacity during FMDV replication within the limits of pH 7.3 – 7,6.

Significant differences were not observed during the study of virus yield obtained from two different media (Table 1). Cell affection was about 90% in 12 hours after

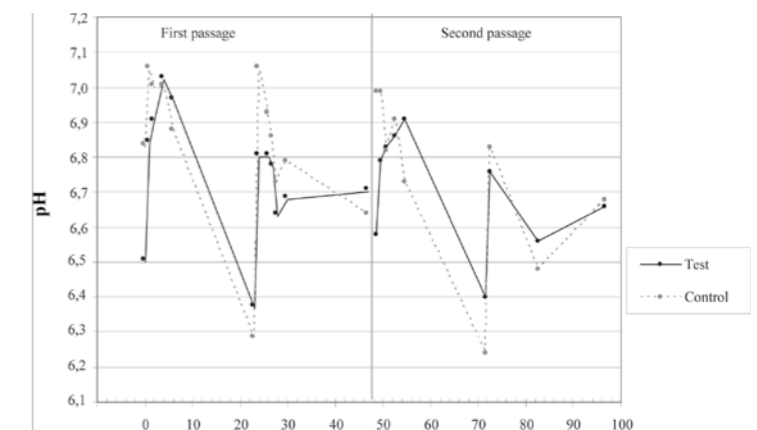


Fig. 1. Dynamics of pH changes during cultivation of BHK-21/2-17 cells in different media.

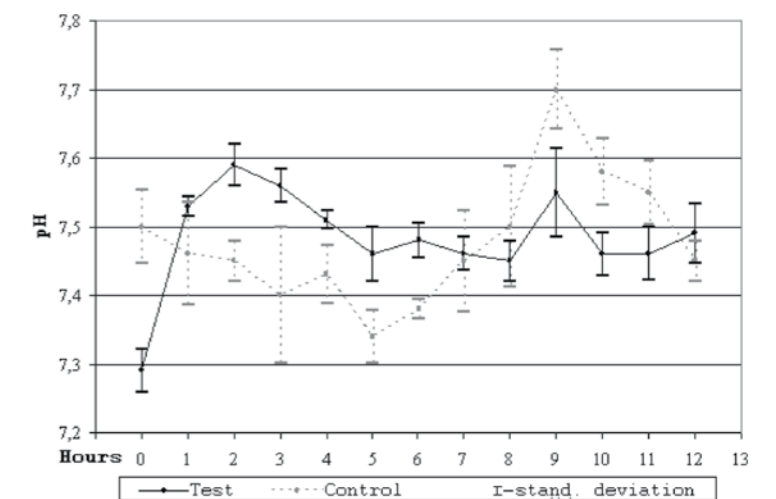


Fig. 2. Dynamics of pH changes during FMDV replication in different media.

infection, and the amount of viral protein was 0.63-0.64 µg/cm<sup>3</sup> with 1 mln cells.

During the study of FMDV replication in Klin flasks in monolayer cell culture PSGK-30, significant differences were observed in the amount of viral protein obtained. In HEPES-based medium the amount of 0.56±0.049 µg/cm<sup>3</sup> was obtained, in control medium – 0.31±0.045 µg/cm<sup>3</sup> (n=3), what is much lower (p±0.05). pH remained unchanged during 18 hours within the limits of 7.15-7.45 in test medium and 7.2-7.35 – in control medium. Infectivity titer of the virus was



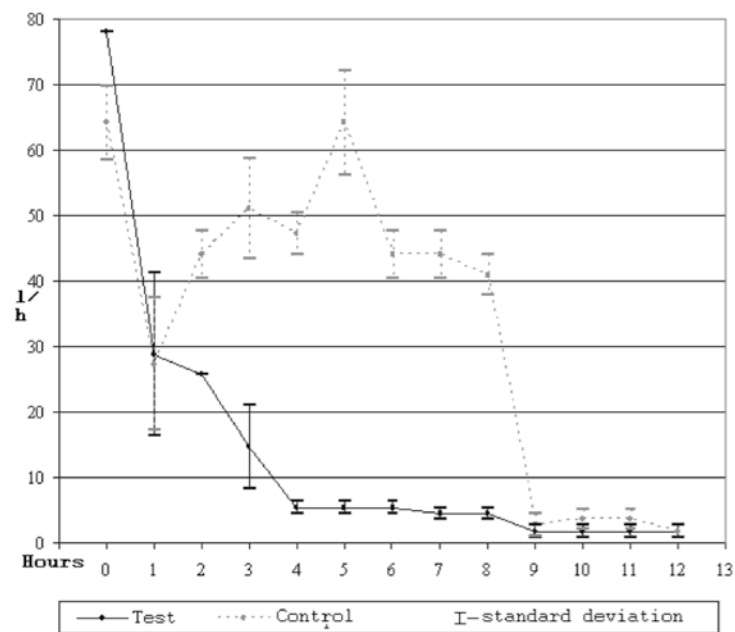


Fig. 3. Dynamics of changes in air consumption by BHK-21/2-17 cells during FMDV replication.

$7.33 \pm 0.167 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Thus, in case of rather stable acid-base balance in both media, the amount of the obtained viral protein was higher in test medium during virus replication in Klin flasks.

### CONCLUSION

The study results show that during cultivation of BHK-21/2-17 cells in glass cultivators (volume – up to 30 dm<sup>3</sup>), proliferation index of cells was the same both in test medium and in control medium. For maintaining required pH in both media, the same amount of air and sodium bicarbonate were consumed.

The comparison of media based on different buffers in Incubations schüttelschrank BS 4 (shaker) showed that HEPES-containing medium provided better buffer capacity than the medium based on phosphate-bicarbonate buffer.

The comparison of FMDV replication in media based on two kinds of buffers in glass cultivators, demonstrated that pH variations in test medium were much less than in the control medium, and air consumption was 14-23 times lower than in the medium based on phosphate-bicarbonate buffer. Significant differences were not observed during the study of virus yield obtained from two different media.

During FMDV replication in Klin flasks, significant differences were observed in the amount of viral protein obtained. In HEPES-based medium the amount of  $0.56 \pm 0.049 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  was obtained, and in control medium –  $0.31 \pm 0.045 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (n=3).

Therefore HEPES-based medium provided better maintenance of acid-base balance within the limits of pH 7.3 – 7.6, and it is more reasonable to use it for FMDV replication.

### REFERENCES

1. Animal cell in culture (Methods and application in biotechnology)/ under the editorship of L.P. Dyakonov, V.I. Sit'kov – M.: Sputnik+, 2000. – 400 p.
2. L.L. Katalymov, N.A. Mangusheva Effect of carbon dioxide on development of nerve fiber block // *Sovremennyye naukoymkie tekhnologii*. – 2006. – No. 6. – p. 71-72.
3. N. Kuzmina Section "Animal cell and tissue cultures". Cell cultivation. Nutrient media and culture conditions // *Biotekhnologiya*. – 1995-2010. – URL: [http://www.biotechnolog.ru/acell/acell1\\_4.htm](http://www.biotechnolog.ru/acell/acell1_4.htm)
4. Yu. P. Shchelkunova, V.I. Yeremets Proliferative activity of the permanent cell line (SSO-3) derived from the pool of the Siberian sturgeon viscera ACIPENSER BAERI under different culture conditions // *Veterinary vrach*. – 2010. – No. 2. – p. 35-39.

### Influence of nutrient media formulation on FMDV replication

Medium	Cell concentr., mln/cm <sup>3</sup>	Amount of virus protein, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$			%affected cells	Virus replication time, hours
		After inactivation and purification	146+75S, (% to total)	146+75S with 1 mln cells		
Test	3,00	2,10	1,80 (85,7)	0,72	90	11
	2,72	1,87	1,73 (92,5)	0,64	89	10
	3,40	2,32	1,81 (78,0)*	0,53*	91	12,5
	$3,04 \pm 0,198$	$2,09 \pm 0,129$	$1,78 \pm 0,025$ (85,5 $\pm$ 4,188)	$0,63 \pm 0,055$	$90 \pm 0,577$	$11,1 \pm 0,73$
Control	2,60	2,10	1,76 (83,8)	0,68	87	11,5
	3,46	2,84	2,48 (87,3)	0,70	90	12
	2,60	1,72	1,37 (79,7)	0,53	96	10,5
	$2,89 \pm 0,287$	$2,22 \pm 0,329$	$1,87 \pm 0,325$ (83,6 $\pm$ 2,196)	$0,64 \pm 0,054$	$91 \pm 2,646$	$11,3 \pm 0,44$

\*-only 146S-components



# ПУТИ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ СВИНОВОДСТВА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

А.А. Гусев<sup>1</sup>, П.А. Красочко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАСХН, академик РАЕН, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup> доктор ветеринарных и биологических наук, профессор, академик РАЕН, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск, Беларусь

### РЕЗЮМЕ

Показаны пути заноса и распространения инфекционных заболеваний свиней на свиноводческие комплексы Республики Беларусь. Приведены оптимальные схемы специфической профилактики вирусных и бактериальных инфекций различных половозрастных групп свиней, что позволяет стабилизировать эпизоотическую обстановку свинокомплексов в отношении экономически значимых инфекционных болезней.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эпизоотическая ситуация, свиноводческие комплексы, инфекционные заболевания, специфическая профилактика, ветеринарно-санитарные мероприятия, живые и инактивированные вакцины.

### ВВЕДЕНИЕ

Свиноводство в Беларуси является одной из ведущих отраслей животноводства. Численность свиней в республике составляет в общественном секторе более 3750 тысяч голов, в фермерских хозяйствах и личной собственности крестьян – 1336,5 тысячи.

Стратегическим направлением в повышении эффективности свиноводства может стать создание в едином звене вертикально интегрированных комплексов, включающих в себя производство зерна и комбикормов, выращивание и переработку свинины, реализацию готовой продукции и финансовые структуры. Такая форма интеграции снижает себестоимость свинины в 1,5-2 раза. Это происходит за счет высокой специализации, правильной организации технологического процесса на всех этапах производства, внедрения новейшего оборудования. По такому пути идут многие экономически развитые страны, он реален и для Беларуси.

Предприятия, объединенные в единый технологический процесс, как правило, имеют стабильные результаты, а если допускаются сбои в рабо-





№	Наименование мероприятия	Сроки, дни
1	Размещение завозимых племенных подсвинков на карантин, расстояние от основного поголовья фермы не менее 50 м	не менее 4 недель
2	Контрольные исследования на болезнь Ауески, репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС), атрофический ринит, лептоспироз	при поступлении
3	Рекомендуется поместить в группу ввозимого племенного молодняка несколько подсвинков маточного стада для выявления заразных болезней	на период карантина
4	Вакцинация против лептоспироза в возрасте	140
5	Вакцинация против парвовирусной инфекции свиней (ПВИС) и репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в возрасте	170-180
6	Вакцинация против классической чумы свиней (КЧС) в возрасте	195-200
7	Дегельминтизация в возрасте	145-150
8	При отсутствии заболеваемости, отрицательных результатах контрольных исследований и после вакцинаций	

Таблица 1. Схема профилактических мероприятий при введении в стадо приобретаемых племенных свиней

те отдельных звеньев, то они устраняются быстро и менее болезненно. Входящие в состав интегрированного комплекса формирования разрабатывают оптимальную ценовую политику, позволяющую рентабельно работать всем производствам, доля прибыли которых зависит от конечных результатов.

Такая форма организации позволяет снять остроту проблемы снабжения кормами. От перебоев в кормлении особенно страдают крупные производители свинины, не имеющие собственных земельных угодий. Разрозненное функционирование производителей зерна, комбикормовых заводов и свинокомплексов приводит, как правило, к увеличению себестоимости свинины. Естественно, что при таком положении производство свинины может становиться нерентабельным.

Вовлечение в производство свинины фермеров и крестьян можно осуществлять через холдинги, в которые входят племрепродукторы, комбикормовые заводы и мясоперерабатывающие предприятия. Между холдингом и хозяйством заключаются договоры, по которым сельскохозяйственные производители получают порослят-отъемышей, комбикорм и ветеринарное обслуживание, взамен обязуясь сдавать откормленных товарных свиней на мясоперерабатывающие предприятия агрохолдинга. С крестьянами рассчитываются, вычитая с них стоимость получаемых молодняка свиней, комбикормов и ветеринарных услуг.

Высокая концентрация поголовья свиней на сравнительно небольшой территории республики, быстро развивающиеся международные связи и большая протяженность сухопутных границ создают посто-

янную угрозу заноса в нашу страну инфекционных болезней, в том числе особо опасных (ящур, африканская чума свиней и др.). Однако наряду с острыми инфекционными болезнями, на предупреждение заноса и профилактику которых обращается основное внимание ветеринарной службой республики, большое значение имеют и другие заболевания свиней.

Особенно серьезные и многофакторные ветеринарные проблемы возникают на крупных свиноводческих комплексах. Здесь большой урон наносят латентные инфекции: болезнь Ауески, репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС), энзоотическая пневмония, сальмонеллез, дизентерия, колибактериоз и др. Из-за циркуляции возбудителей среди свинопоголовья и нарушения санитарных норм содержания и кормления эти болезни могут проявляться энзоотически, круглогодично. Эпизоотическая ситуация на свиноферме, клинические признаки болезни и результаты вскрытия павших животных дают возможность заподозрить ту или иную патологию. Однако только результаты лабораторных исследований придают уверенность практическим ветеринарным специалистам в правильности проводимых ими мер.

Надежным способом предотвращения инфекций, наряду с соблюдением санитарных норм, служит точная и быстрая диагностика и своевременная вакцинация животных. Причем для каждой возрастной группы свиней должен применяться свой план профилактических мероприятий.

Закупаемые животные могут быть опасными источником заноса инфекции на свиноводческое предприятие и причиной появления совершенно новых болезней или вспышек инфекций, которые до этого на ферме были под контролем.

Основными путями заноса болезней могут быть следующие:

- свиньи-носители, которые сами инфицированы без клинических признаков заболеваний, при возникновении стрессовых ситуаций способствуют выделению возбудителей во внешнюю среду;
- свиньи после перенесенной болезни определенное время могут быть источником инфекционного начала;
- свиньи, которые находятся в начальной, инкубационной стадии болезни;
- свиньи, клинически больные.

Возбудители болезней могут переноситься через транспортные средства при отсутствии должной их очистки и дезинфекции после использования для перевозок животных или животного сырья, а также через инфицированные предметы, одежду, грызунов, насекомых и т.д.

Лучшую гарантию по обеспечению здоровья поголовья представляет, наряду с высоким гигиеническим стандартом, закрытость свиноводческих предприятий.

Наименьший риск бывает при пополнении поголовья за счет ремонтных животных собственных ферм. Если же необходимо закупать племенной молодняк из других хозяйств, то наиболее приемлемым вариантом является приобретение животных из одних и тех же предприятий. Это снижает опасность заноса возбудителей инфекций в маточное стадо извне. В данном звене технологического процесса следует проводить мероприятия, отражаемые в таблице 1.

Перед завозом племенных свиней покупатель должен иметь информацию о благополучии хозяйства,



МЕРОПРИЯТИЯ	СРОКИ ПРОВЕДЕНИЯ
<b>СУПОРСНЫЕ СВИНОМАТКИ</b>	
Вакцинация против лептоспироза	через 25-30 дней
Вакцинация против рожи и болезни Ауески	через 35-40 дней
Вакцинация против РРСС	через 50-55 дней
Вакцинация против колибактериоза и трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС)	через 60-65 дней
*Вакцинация против пастереллеза и сальмонеллеза	70-80 дней
Вакцинация против колибактериоза и трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС)	через 100-105 дней
<b>ПОДСОСНЫЕ СВИНОМАТКИ</b>	
Вакцинация против парвовирусной инфекции свиней (ПВИС) и репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС)	через 10-15 дней после опороса
Вакцинация против классической чумы свиней	через 25-30 дней после опороса
Мойка и профилактическая обработка против саркоптоза (чесотки)	перед направлением на опорос за 14 дней до опороса и на второй день после отъема порослят
Дегельминтизация	

\*Вакцинация проводится при установлении диагноза

Таблица 2. Схема профилактических мероприятий при содержании свиноматок



НАИМЕНОВАНИЕ МЕРОПРИЯТИЯ	СРОКИ ПРОВЕДЕНИЯ, ДНИ ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ
*Вакцинация против сальмонеллеза и пастереллеза	20-22
Вакцинация против колибактериоза и репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС)	25-27
Повторная вакцинация против РРСС	35-38
Обработка против балантидиоза и эймериоза	по показаниям
Отъем	35-40

\*Вакцинация проводится при установлении диагноза

Таблица 3. Профилактические мероприятия при выращивании поросят-сосунов

откуда ведется закупка животных. Лабораторные исследования необходимо проводить не только в отношении закупаемых групп молодняка свиней, но и остального поголовья стада поставщика.

Профилактические мероприятия направляют на защиту здоровья поголовья свиноматок и создание стадного иммунитета. Вакцинация супоросных и подсосных свиноматок имеет некоторые различия (табл.2).

### ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ПОРОСЯТ-СОСУНОВ

Устойчивость новорожденных поросят зависит в основном от уровня колостральных антител, полученных от матери с молозивом. Они обеспечивают защиту сосунов в первые дни жизни от инфекционных болезней. С 3-недельного возраста уровень колострального иммунитета снижается и поросята начинают вырабатывать собственные антитела. Чем напряженнее иммунитет свиноматки, тем сильнее защита поросят. Однако, абсолютной защиты поросят

от инфекции в раннем возрасте не существует. Основными входными воротами для возбудителей болезней является рот новорожденных поросят, куда может попадать возбудитель с пола животноводческих помещений, с рук персонала, поилок, кормушек, с вымени матерей, кожи животных, из фекалий и мочи свиноматок. Возбудители могут передаваться также через органы дыхания при чихании и кашле больных поросят. При этом часто бывает недостаточным напряженный колостральный иммунитет у поросят, переданный от матери.

Основные защитные меры в этой возрастной группе свиней показаны в таблице 3.

### ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ОТКОРМА СВИНЕЙ

В закрытой системе, т.е. при откорме молодняка свиней, выращенных на собственном предприятии, проблем с заболеваемостью поголовья сравнительно мало. Стадный иммунитет остается стабильным, пока не поступают новые животные. Необходимость в лечении может длительное время отсутствовать, если в отношении свиноматок и поросят-сосунов регулярно проводились необходимые обработки.

Серьезные трудности возникают только после закупки молодняка свиней из других хозяйств. Даже свиньи из благополучных соседних хозяйств могут вывести стадный иммунитет из состояния равновесия благодаря попаданию на предприятие возбудителей болезней, не характерных для данной фермы. Это диктует необходимость проведения защитных мероприятий и в данной возрастной группе животных (табл. 4).

Вакцинации свиней против вирусных и бактериальных инфекций, не указанных в приведенных нами схемах и регистрируемых в хозяйствах, проводится в установленном порядке согласно инструкциям.

Для вакцинаций и других профилактических обработок свиней необходимо использовать вакцины и препараты, выпускаемые биологическими и фармацевтическими предприятиями, зарегистрированными в Республике Беларусь. Они должны соответствовать требованиям, храниться и использоваться строго согласно инструкциям по применению. В случае обнаружения отклонений во внешнем виде препаратов или появлении осложнений при их применении на животных использование вакцин и других лечебно-профилактических средств запрещается. Об этом уведомляются государственные органы ветеринарного надзора и при необходимости - производители средств, а образцы вакцин и препаратов данной партии направляются для лабораторного анализа.

Выполнение рекомендуемых ветеринарно-профилактических мероприятий позволит поддерживать эпизоотическое благополучие свиноводства республики, повысить рентабельность отрасли, сократить потери и производить продукцию, по качеству и безопасности отвечающую международным требованиям.



## PATHWAYS FOR PROVISION OF FREEDOM FROM PORCINE DISEASES IN THE REPUBLIC OF BELARUS

A.A. Gusev<sup>1</sup>, P.A. Krasochko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Agricultural Sciences, Member of Russian Academy of Natural Sciences, RUI "Institute for Experimental Veterinary Medicine n.a. S.N. Vysheslesky", Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Doctor of Science (Veterinary Medicine and Biology), Professor, Member of Russian Academy of Natural Sciences, RUI "Institute for Experimental Veterinary Medicine n.a. S.N. Vysheslesky", Minsk, Belarus

### SUMMARY

The form of organization of pig production industry in Belarus is based on the creation of a unitary industrial complex. The main task of the veterinary services is the monitoring of serious and polyfactorial problems at the primary stage. Preventive measures enable to maintain freedom from porcine diseases in the Republic and to raise profitability of pig production industry.

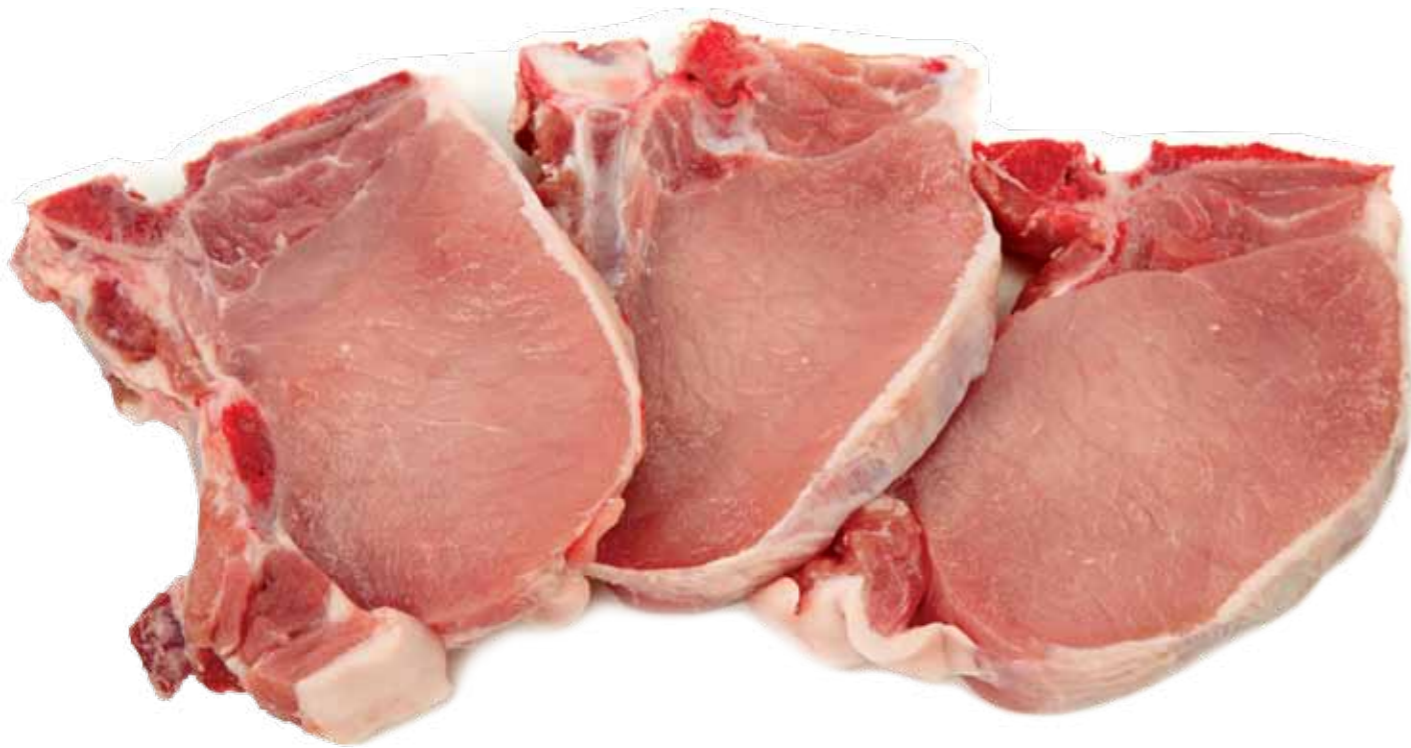
Key words: pig production, disease diagnostics, veterinary and preventive measures.

### INTRODUCTION

Pig production in Belarus is one of the leading industries of animal production. The population of pigs in the Republic in the public sector is more than 3, 750 thousand animals, on farms and in private ownership - 1, 336.5 thousands animals.

A strategic approach to improvement of pig production efficiency can be a creation of vertically integrated complexes including grain and compound feed production, growing of pigs and pork processing, marketing of finished products and financial structures. Such form of integration results in 1.5 – 2 fold decrease in pork production cost. This is the outcome of high specialization, correct arrangement of technological process at all production





stages and introduction of novel equipment. This is the way followed by many economically developed countries and it is practicable in Belarus as well.

As a rule the establishments united into a single technological process give stable results and if any failures occur in the work of a separate link they can be removed quickly and without any serious consequences. Organizations comprised by an integrated complex develop their own optimal pricing policy enabling all production establishments operate profitably. The profit share of these establishments depends on final results.

Nº	Measure to be taken	Time, days
1	Placement under quarantine of breeding gilts, the distance from the main herd at least 50 m	At least 4 weeks
2	Tests for Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), atrophic rhinitis, leptospirosis	When received
3	It is recommended to place several gilts from parent stock into a group of received breeding young animals to detect contagious diseases	For quarantine period
4	Vaccination against leptospirosis at	140
5	Vaccination against porcine parvoviral infection (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) at	170-180
6	Vaccination against classical swine fever (CSF) at	195-200
7	Anthelmintic treatment at	145-150
8	In case of no morbidity, negative test results and after vaccination and quarantine replacement gilts enter an insemination room	

Table 1. Schedule of prevention measures to be taken when purchased breeding pigs are introduced into the herd.

Such form of organization makes it possible to relieve the problem of feed supply. Large pork producers which do not own any agricultural lands suffer from the breaks in feed deliveries. As a rule separate functioning of grain producers, compound feed mills and pig farms results in an increase in pork production cost. For sure under such conditions the pork production may become unprofitable.

Involvement of farmers and peasants into pork production may be carried out through holding companies uniting breeding establishments, compound feed mills and meat processing plants. A holding company and a farm enter into agreements according to which agricultural producers receive weanling pigs, compound feed and veterinary service and farmers are obliged to send fattened slaughter pigs to meat-processing plants of an agricultural holding. The payment to peasants is made by withholding the cost of received young animals, compound feed and veterinary service.

A high density of pig population in a comparatively small territory of the Republic, rapidly developing international links and a long mileage of land borders create a constant threat of infectious disease introduction including highly dangerous diseases (FMD, African swine fever, etc.). But in addition to acute infectious diseases which introduction prevention and prophylaxis is the focus of the Republic Veterinary Services other porcine diseases are of high importance as well.

Especially serious and polyfactorial veterinary problems occur at large pig farms. Such latent infections as Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), enzootic pneumonia, salmonellosis, dysentery, colibacteriosis cause great damages there. These diseases may be enzootic all-the-year-around due to agent circulation in pig population and violation of management and feeding health standards. The epidemic situation at pig farm,

clinical signs of a disease and results of postmortem examination enable to suspect a particular pathology. However only laboratory testing results assure veterinary practitioners in the correctness of measures taken.

Accurate and rapid diagnostics and timely animal vaccination as well as fulfillment of health standards appear to be a reliable pathway to prevent infections. Moreover every age group of pigs requires its own schedule of prevention measures.

Purchased animals can pose a dangerous source of infection introduction into pig farm and cause of emerging of absolutely new diseases or infection outbreaks which were under control at farm before.

The main routes of disease introduction can be:

- pig-carriers, infected without any disease clinical signs which shed agents in stress situations;
- convalescent pigs may be a source of infection for some time;
- pigs at initial latent stage of disease;
- clinically diseased animals.

Disease agents may be transmitted by transport vehicles not subjected to an appropriate cleaning and disinfection after transportation of animals and animal raw materials and by infected things, clothes, rodents, insects, etc.

Closed type operation of pig farms and high hygienic standards appear to be the best guarantee of population health assurance.

Restocking by replacement animals from internal farms pose a minimal risk. If it is required to buy young breeding animals from other farms the most reasonable way is to purchase animals from the same farms invariably. This decreases the danger of infection agent introduction into a parent stock from outside. In this link of the technological process the measures mentioned in Table 1 should be taken.

Before breeding pigs are delivered a purchaser shall be informed on the epidemic situation at farm where animals are bought. The laboratory tests shall be carried out not only in purchased young animals but in the rest of the herd of a supplier.

Prevention measures are aimed at health protection of breeding sow population and immunity conferring on the herd. Vaccination of pregnant sows differs from nursing sow vaccination to some degree.

#### PREVENTION MEASURES WHEN SUCKLING PIGS ARE GROWN

The resistance of newborn pigs is mostly associated with the level of colostrum antibodies acquired from mother's colostrum. These antibodies provide protection from infectious diseases for suckling pigs during the first days of life. From 3 weeks of age the level of colostrum immunity decreases and piglets start developing their own antibodies. The stronger sow's immunity is the higher the level of protection for piglets is. But there is no absolute protection of piglets from infection at early age. The main infection atrium is a mouth of a newborn piglet; infection agent may entry from the floor of the premises, personnel hands, drinking bowls, feeding pans, mother's udder, animal skin, sows' faeces and urine. Agents can be transmitted through respiratory organs when diseased piglets sneeze or cough. In addition pig's colostrum immunity may be not strong enough.

The main protection measures at this age are shown in Table 3.



#### PREVENTION MEASURES TAKEN DURING THE STARTING PERIOD OF PIG FATTENING

In the closed type system, i.e. when young pigs grown at the same establishment are fattened, there are not many problems associated with morbidity. The herd immunity remains stable until new animals are introduced. The medication may be not necessary for a long time if sows and suckling pigs were regularly subject to appropriate treatments.

MEASURES TO BE TAKEN	TIME
<b>PREGNANT SOWS</b>	
Vaccination against leptospirosis	in 25 – 30 days
Vaccination against erysipelas and Aujeszky's disease	in 35 – 40 days
Vaccination against PRRS	in 50 – 55 days
Vaccination against colibacteriosis and transmissible gastroenteritis (TGE)	in 100 – 105 days
*Vaccination against pasterellosis and salmonellosis	
<b>NURSING SOWS</b>	
Vaccination against porcine parvoviral infection (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)	10 – 15 days post farrow
Vaccination against classical swine fever (CSF)	25 – 30 days post farrow
Washing and prevention treatment against sarcoptic mange	14 days before farrow and on 2-nd day after weaning
Anthelmintic treatment	

\* Note: Vaccination is carried out when diagnosis is made

Table 2. Schedule of prevention measures when sows are managed





MEASURE TO BE TAKEN	TIME, DAYS POST BIRTH
*Vaccination against salmonellosis and pasterellosis	20-22
Vaccination against colibacteriosis and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)	25-27
Revaccination against PRRS	35-38
Treatment against balantidiasis and eimeriosis	According to indications
Weaning	35-40

\*Vaccination is carried out when diagnosis is made

Table 3. Prevention measures when suckling pigs are grown

Serious difficulties arise only after young pigs from other farms are bought. Even pigs from neighboring farms free from diseases may disturb the balance of the herd immunity due to introduction of disease agents not typical for this farm. This fact results in the necessity to carry out prevention measures at this age too (Table 4).

Vaccination of pigs against viral and bacterial infections not indicated in the abovementioned schedules and registered on farms is carried out according to the procedure established in the instructions.

For vaccination and other prevention treatments of pigs it is necessary to use vaccines and preparations produced by biological and pharmaceutical plants authorized in the Republic of Belarus. They shall comply with the requirements, be stored and used exactly according to application instructions. If any deviations in the appearance of a preparation are found or any complications when used in animals occur the usage of vaccines and other therapeutic preparations is prohibited. The official bodies of the veterinary surveillance and if applicable the manufactures are notified about this fact and the samples of vaccines and preparations from this batch are submitted to laboratory analysis.

The implementation of the recommended veterinary and preventive measures will enable to maintain the freedom of the Republic pig production from diseases, to raise profitability of the industry, limit the losses and produce the products complying with the international quality and safety requirements.

# ЛОКАЛИЗАЦИЯ АТТЕНУИРОВАННОГО И ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА СЕРОТИПА 1 В ОРГАНИЗМЕ ЦЫПЛЯТ

Е.А. Чичерина<sup>1</sup>, М.И. Шульпин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ведущий ветеринарный врач ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>2</sup>ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

## РЕЗЮМЕ

В PCR Real time исследовали образцы тканей различных органов цыплят и определяли количество циклов амплификации праймированных участков геномов аттенуированного и вирулентного штаммов вируса болезни Марекка через заданные интервалы времени после их инокуляции. Установили, что динамика накопления обоих вариантов вируса имела явное сходство, однако в абсолютных величинах воспроизводство вирулентного значительно превосходило аттенуированный.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

болезнь Марекка, ПЦР, накопление ВБМ в организме птицы.

## ВВЕДЕНИЕ

Распространение вируса болезни Марекка (БМ) в организме птиц было исследовано достаточно подробно [4, 5, 6, 8, 9], однако в большинстве сообщений результаты были получены путем выделения и оценки концентрации инфекционного вируса на чувствительных тест-объектах: развивающихся эмбрионах или культурах клеток. При этом процедура выявления и титрования вируса данного вида является длительной и трудоемкой [7]. Например, для титрования вируса в первичной культуре фибробластов эмбрионов кур (с учетом приготовления самой культуры) требуется от 96 до 120 ч [2].

В проведенной работе были определены следующие направления исследований. Установить возможность использования PCR Real time для изучения распространения различных по вирулентности штаммов вируса БМ в организме птицы [1]. Сравнить накопление генетического материала двух вариантов вируса в тканях различных органов и провести соответствующий сравнительный анализ, используя способ опосредованной оценки инфекционного титра ВБМ [3].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. Штамм «3004» ВБМ 1 серотипа, аттенуированный, депонированный в коллекции микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ».

Штамм «Md5» ВБМ 1 серотипа из коллекции ATCC (American Type Culture Collection), адаптирован в ФГБУ «ВНИИЗЖ» к культуре клеток кожи СПФ-эмбрионов кур.

В работе использовали вирусный материал в виде суспензии инфицированных клеток первичной культуры фибробластов СПФ-эмбрионов кур. Инфицирующая доза вируса обоих штаммов составила 3,48 Ig ФОЕ/0,2 см<sup>3</sup>.

Подопытная птица. Эксперимент проводили на суточных клинически здоровых цыплятах, не иммунных к БМ. Птицу содержали в виварии ФГБУ «ВНИИЗЖ» в изолированных ламинарных боксах, оснащенных следующим: приточно-вытяжной вентиляцией с системой стерилизующей фильтрации воздуха обоих потоков; автоматическими поилками; шлюзовой системой подачи корма и изолированной системой канализации с последующей дезинфекцией отходов. Рацион кормления цыплят, освещения боксов, а также влажностный и температурный режимы соответствовали зоогигиеническим нормам содержания птиц соответственной возрастной категории.

Полимеразная цепная реакция (PCR). Выделение ДНК проводили методом сорбции на силикагеле с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб-50» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно прилагаемому протоколу.

Использовали реакционную смесь, в состав которой входили: ПЦР-буфер (Promega), MgCl<sub>2</sub> (Promega) 2,5 мМ, dNTP's (Fermentas) 0,4 мМ каждого, праймер MEQ-1341f 0,8 мкМ, праймер MEQ-1413r 0,8 мкМ, ДНК-







зонд MEQ-FAM-1366 0,8мкМ, Таq-ДНК-Полимераза (Promega) 5 ед. акт., суммарная ДНК 10 мкл, вода 20 мкл.

Температурный режим реакции: прогрев реакционной смеси - 94°C 10 мин.; денатурация - 94°C 20 с; отжиг праймеров и учет данных - 58°C 20 с; элонгация - 72°C 20 с. Количество циклов - 40. [1].

Опосредованная оценка инфекционной активности вируса. Ожидаемую величину титра ВБМ 1 серотипа вычисляли, используя следующее уравнение [3]:

$$lg^*T/v = (-0,253)Ct + 9,990,$$

где:  $lg^*T$  – прогнозируемое значение титра (ФОЕ);  $v$  – объем исследуемого образца в ПЦР (0,1 см<sup>3</sup>);  $Ct$  – количество циклов амплификации; (-0,253) и 9,990 – эмпирические коэффициенты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были сформированы две группы птиц: первая из 19, вторая – из 15 голов. Цыплят первой группы в первые сутки жизни заразили штаммом «3004», внутримышечно в объеме 0,2 см<sup>3</sup>, цыплят второй группы инфицировали штаммом «Md5» аналогичным способом в том же объеме. За обеими группами установили ежедневный клинический контроль.

Через заданные интервалы времени у 2-3 цыплят каждой группы отбирали образцы крови и тканей различных органов. Отбор проб осуществляли строго асептически в ламинарах 2-го уровня биобезопасности. Полученные образцы исследовали в PCR.

Результаты PCR в виде оценок числа циклов амплификации (Ct) праймированных участков геномов обоих вариантов вируса, соответственно изученных органов и временных интервалов, представлены графически на рисунке.

Результаты, представленные на рисунке в виде хронологических графиков значений Ct, позволили сделать ряд следующих выводов.

В большинстве образцов крови и тканей изученных органов профили графиков средних значений Ct обоих вариантов вирусов обнаруживали определенное подобие. Максимумы и минимумы концентрации вирусных геномов наблюдались через одинаковые временные интервалы, что свидетельствует о признаках синхронности развития аттенуированного и вирулентного вирусов в организме птицы. Это, в свою очередь, может указывать на идентичность их тропизма.

При равных условиях (доза инокуляции вируса, изучаемые органы и временные интервалы) практически во всех случаях число Ct, установленное у вирулентного вируса, было очевидно ниже, чем у аттенуированного. Это означало, что количество накопленного вируса в организме птицы и далее амплифицируемого генетического материала данного штамма было существенно больше. Следовательно, интенсивность воспроизводства вируса штамма «Md5» превосходила накопление вируса штамма «3004». Например, установленная по уравнению опосредованного расчета [4] ожидаемая величина инфекционного титра вируса (ФОЕ/см<sup>3</sup>) на 7-е сутки эксперимента в бурсе составила 3,57 lg для аттенуированного и 5,91 lg для вирулентного штаммов. Накопление инфектов на 14 сутки в крови достигло значений 1,53 lg и 3,60 lg, для аттенуированного и вирулентного вирусов соответственно. При этом, в нервных волокнах на 21 сутки концентрация аттенуированного и вирулентного возбудителей составляла 1,60 lg и 4,50 lg и в этот период в коже – 1,20 lg и 4,44 lg, соответственно. Таким образом, интенсивность репродукции вирулентного вируса в отмеченных органах и временных точках превосходила аттенуированный штамм от 200 до 1700 раз.

Кроме этого прослеживалась динамика распространения обоих вариантов вируса в организме пти-

цы. Первый максимум накопления вирусных геномов (т.е. минимум Ct) имел место на 5-7 сутки в лимфоидных органах, а именно бурсе и селезенке. Далее оба возбудителя постепенно накапливались в крови, коже и нервных волокнах. После 10 суток развития инфекционного процесса концентрация обоих вирусов не демонстрировала явной тенденции к снижению, т.е. вирус в организме птицы сохранялся в некотором постоянном титре.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных работ установили, что хронология развития аттенуированного и вирулентного вирусов в организме цыплят была схожей. Были идентичными и органы-мишени. Максимумы и минимумы концентрации вирусных геномов в заданных интервалах времени в большинстве случаев совпадали. При этом интенсивность репродукции вирулентного штамма значительно превосходила воспроизводство аттенуированного вируса.

Таким образом, исследования показали, что PCR Real Time может быть использована как способ изучения динамики распространения вируса болезни Марек в организме птицы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метод выявления вируса болезни Марек серотипа 1 с помощью ПЦР в режиме реального времени / М.И. Шульпин, А.А. Пяткина, Т.И. Ерошина, Н.С. Мудрак // Молекулярная диагностика-2010: сб. тр. VII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. - 2010. - Т. 2. - С. 200-202.

2. Методические рекомендации по определению биологической активности клеточно-ассоциированного и свободного от клеток вируса болезни Марек: методические рекомендации / В.П. Мельников, Е.В. Курненькова, Ш.К. Куляшбекова; ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2000. – 6 с.

3. Соотношение величины инфекционного титра и интенсивности ПЦР для вируса болезни Марек / А.А. Пяткина, М.И. Шульпин, Ш.К. Куляшбекова, А.В. Борисов // Актуальные проблемы инновац. развития вет. науки и практики. Т. LVI. Сборник науч. тр., посвящ. 105-летию ин-та / ТОО «КазНИВИ». – 2010. – С. 285-289.

4. Biggs P.M. Spread of Marek's disease. In L.N. Payne (ed.). Marek's Disease / Martinus Nijhorth. – Boston. – М.А. – 1985. - P. 329-340.

5. Calnek B.W. Influence of age at exposure on the pathogenesis of Marek's disease // J. Natl. Cancer Inst. – 1973. – Vol. 51. – P. 929-939.

6. Calnek B.W., Hitchner S.B. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus // J. Natl. Cancer Inst. - 1969. – Vol. 43. – P. 935-949.

7. Kraft V., Ingwersen P., Monreal G. Zur Methodik der Titration von lyophilisiertem und zellaas-soziiertem Marek-Vakzinen // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. – 1973. - Br. 86. – S. 283-285.

8. Nature of genetic resistance to Marek's disease in chickens / L.F. Lee, P.C. Powell, M. Rennie, L.J.N. Ross, L.N. Payne // J. Natl. Cancer Inst. - 1981. – Vol. 66. – P. 789-796.

9. Spencer J.I., Calnek B.W. Marek's disease: Application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody // J. Vet. Res. - 1970. – Vol. 31. – P. 345-358.

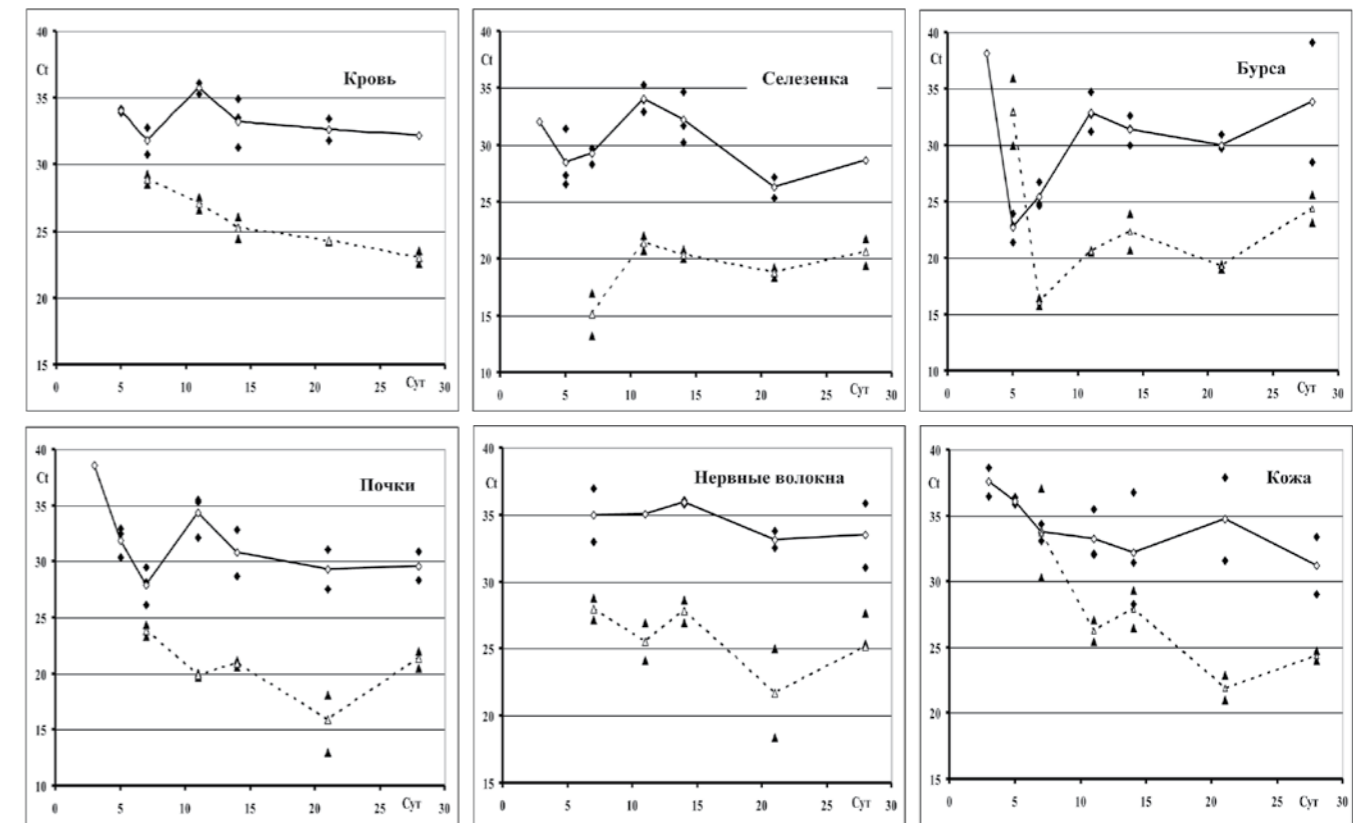


Рис. Диаграммы количества циклов амплификации (Ct) праймированных участков генома вакцинного (●) и вирулентного (▲) вирусов, установленных в PCR Real Time в тканях различных органов цыплят соответственно времени после инокуляции (сут). В виде графиков даны распределения средних оценок Ct (◊ и Δ).



# LOCALIZATION OF ATTENUATED AND VIRULENT SEROTYPE 1 STRAINS OF MAREK'S DISEASE VIRUS IN CHICKENS

Ye.A. Chicherina<sup>1</sup>, M.I. Shulpin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leading Veterinarian of FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

## SUMMARY

Tissue samples from different organs of chickens were tested in real-time PCR and number of amplification cycles of primed genome fragments of attenuated and virulent Marek's disease virus strains was determined at defined time intervals after inoculation. It was found out that accumulation dynamics of both virus variants were obviously similar, though replication of the virulent virus significantly exceeded the attenuated one in absolute values.

Key words: Marek's disease, PCR, accumulation of MDV in bird's body

## INTRODUCTION

Spread of Marek's disease in birds has been studied rather thoroughly [4, 5, 6, 8, 9]. However, most reports included results obtained by isolation and assessment of concentration of infectious virus in sensitive test-objects: developing embryos and cell cultures. Nevertheless, procedure of the virus isolation and titration is time-consuming and labour-intensive [7]. For example, titration of the virus in primary chicken embryo fibroblasts (preparation of culture included) takes 96-120 hours [2].

The following research trends have been determined within the work performed: to determine a possibility of using real-time PCR for studying spread of Marek's disease virus strains of different virulence in birds [1]; compare genetic material of two virus variants in tissues from different organs and perform a corresponding comparative analysis using indirect assessment of infectious titer of MDV [3].

## MATERIALS AND METHODS

Viruses. Serotype 1 strain "3004" of MDV is attenuated and deposited in the collection of microorganisms of the FGBI "VGNKI".

Serotype 1 strain "Md5" of MDV from collection ATCC (American Type Culture Collection) was adapted to SPF-chicken embryo skin (CES) cell culture in the FGBI "ARRIAH".

Suspensions of infected cells of primary SPF-chicken embryo fibroblast culture were used as virus material in

this research. Infectious dose of both strains was 3.48 lg FFU/0.2 cm<sup>3</sup>.

Experimental birds. Day-old clinically healthy chicks that are non-immune to MDV were used for the experiment. The birds were kept in the animal facilities of the FGBI "ARRIAH", in isolated safety cabinets equipped with supply and exhaust ventilation with air sterilization filtration system for two flows; automatic waterers; airlock feeding machine and isolated sewerage system with subsequent waste disinfection. Diet for chickens, illumination intensity in the safety cabinets, humidity and temperature complied with the veterinary hygiene requirements for keeping birds of a corresponding age group.

Polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted by sorption on silica gel using "DNA-sorb-50" commercial kits (the Federal State Institution of Science "Central Research Institute of Epidemiology" of the Rospotrebnadzor, Russia) according to the protocol attached.

The used reaction mixture contained: PCR-buffer (Promega), MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2.5 mM, dNTP's (Fermentas) 0.4 mM of each, primer MEQ-1341f 0.8 μM, primer MEQ-1413r 0.8 μM, DNA-probe MEQ-FAM-1366 0.8 μM, Taq-DNA-Polymerase (Promega) 5 units act., total DNA 10 μl, water - 20 μl.

Temperature conditions: warming up of the reaction mixture for 10 minutes at 94°C; denaturation for 20 seconds at 94°C; primer annealing and data recording for 20 seconds at 58°C; elongation for 20 seconds at 72°C. Number of runs - 40 [1].

Indirect assessment of the virus infectivity. The expected titer of MDV serotype 1 was calculated using the following equation [3]:

## RESULTS AND DISCUSSION

Two groups of birds were formed: 19 birds in Group 1 and 15 birds in Group 2. Chicks from Group 1 were infected intramuscularly with strain "3004" (0.2 cm<sup>3</sup>) on the first day of life. Chicks from Group 2 were infected the same way with strain "Md5" (the same volume). Both groups were under daily clinical control.

Blood and different tissue samples were taken from 2-3 chicks of each group at definite time intervals.



Samples were taken in Class II biosafety cabinets using a strict aseptic technique. The samples taken were tested in PCR.

PCR results demonstrated as a correspondence between number of amplification cycles (Ct) of primed genome segments of both virus variants and the studied organs and time intervals are given in the Figure.

The results given in the form of Ct value chronological graphs enabled us to make the following conclusions.

Graphs of Ct mean values of both virus variants demonstrated a certain similarity for most blood and tissue samples. Maximal and minimal concentrations of virus genomes were observed at equivalent time intervals, thus, demonstrating simultaneous propagation of attenuated and virulent viruses in bird's body. This may be evidence of their tropism identity.

All other conditions being equal (virus inoculation dose, studied organs and time intervals), the Ct value of the virulent virus was evidently lower in almost all cases than that of the attenuated one. It means that amount of virus accumulated in the bird's body and further the amount of amplified genetic material of the given strain was significantly higher. Therefore, replication of strain "Md5" was more intensive than accumulation of strain "3004". For example, the expected infectious titer value (FFU/cm<sup>3</sup>) determined by indirect calculation equation [4] in bursa on day 7 of the experiment was 3.57 lg for the attenuated virus and 5.91 lg for the virulent one.

Accumulation of infectious organisms in blood on day 14 was 1.53 lg and 3.60 lg for attenuated and virulent viruses, correspondingly. In addition to it, at the same period concentration of attenuated and virulent agents in nerve fibers on day 21 was 1.60 and 4.50 lg and 1.20 lg and 4.44 lg in skin, correspondingly. Thus, reproduction of the virulent virus in the mentioned organs and at time

$$\lg T/v = (-0,253)Ct + 9,990,$$

where: lg T – predicted titer (FFU); v – volume of a sample tested in PCR (0.1 cm<sup>3</sup>); Ct – number of amplification cycles; (-0.253) and 9.990 – empirical coefficients.

points was 200 -1700 times more intensive than that of the attenuated strain.

Besides, dynamics of both virus variants spread in the bird's body were observed. First maximum of the virus genome accumulation (i.e. Ct minimum) was observed on day 5-7 in lymphoid organs (in bursa and spleen). Then, the two agents gradually accumulated in blood and nerve fibers. After day 10 there was no obvious downward trend in concentration rate of the two viruses, i.e. permanent virus titer could be observed in the bird's body.

## CONCLUSION

The carried out research demonstrated that both attenuated and virulent virus had similar development cycle in the chicken's body. Target organs were also identical. Maximal and minimal concentrations of the virus genomes at definite time intervals overlapped in most cases. At the same time, reproduction of virulent virus was significantly more intensive than that of the attenuated one.

Thus, the research demonstrated that real-time PCR might be used to study dynamics of Marek's disease virus spread in birds.

## REFERENCES

1. Detection of Marek's disease serotype 1 in real-time PCR/ M.I. Shulpin, A.A Pyatkina, T.I. Yeroshina,





2. Methodical recommendations for determination of biological activity in cell-associated and cell-free Marek's disease virus: methodical recommendations / V.P. Melnikov, Ye.V. Kurenkova, Sh.K. Kulyashbekova; the FGBI "ARRIAH". – Vladimir, 2000 – p.6.

3. Correlation between infectious titer and PCR intensity for Marek's disease virus/ A.A. Pyatkina, M.I. Shulpin, Sh.K. Kulyashbekova, A.V. Borisov// Current issues of innovative development in veterinary science and practice. Vol. LVI. Proceedings devoted to the 105th anniversary of the institute/TOO "KazNivi"-2010 – p. 285-289.

4. Biggs P.M. Spread of Marek's disease. In L.N. Payne (ed.). Marek's Disease / Martinus Nijhorth. – Boston. – M.A. – 1985. – P. 329-340.

5. Calnek B.W. Influence of age at exposure on the pathogenesis of Marek's disease // J. Natl. Cancer Inst. – 1973. – Vol. 51. – P. 929-939.

6. Calnek B.W., Hitchner S.B. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus // J. Natl. Cancer Inst. - 1969. – Vol. 43. – P. 935-949.

7. Kraft V., Ingwersen P., Monreal G. Zur Methodik der Titration von lyophilisierteu und zellaas-soziierteu Marek-Vakzinen // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. – 1973. – Br. 86. – S. 283-285.

8. Nature of genetic resistance to Marek's disease in chickens / L.F. Lee, P.C. Powell, M. Rennie, L.J.N. Ross, L.N. Payne // J. Natl. Cancer Inst. - 1981. – Vol. 66. – P. 789-796. Spencer J.I., Calnek B.W. Marek's disease: Application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody // J. Vet. Res. - 1970. – Vol. 31. – P. 345-358.

N.S.Mudrak//Molecular diagnosis – 2010: Proceedings of the VII All-Russia Scientific and Practical Conference with international participation.- 2010 – Vol. 2. – p. 200-202.

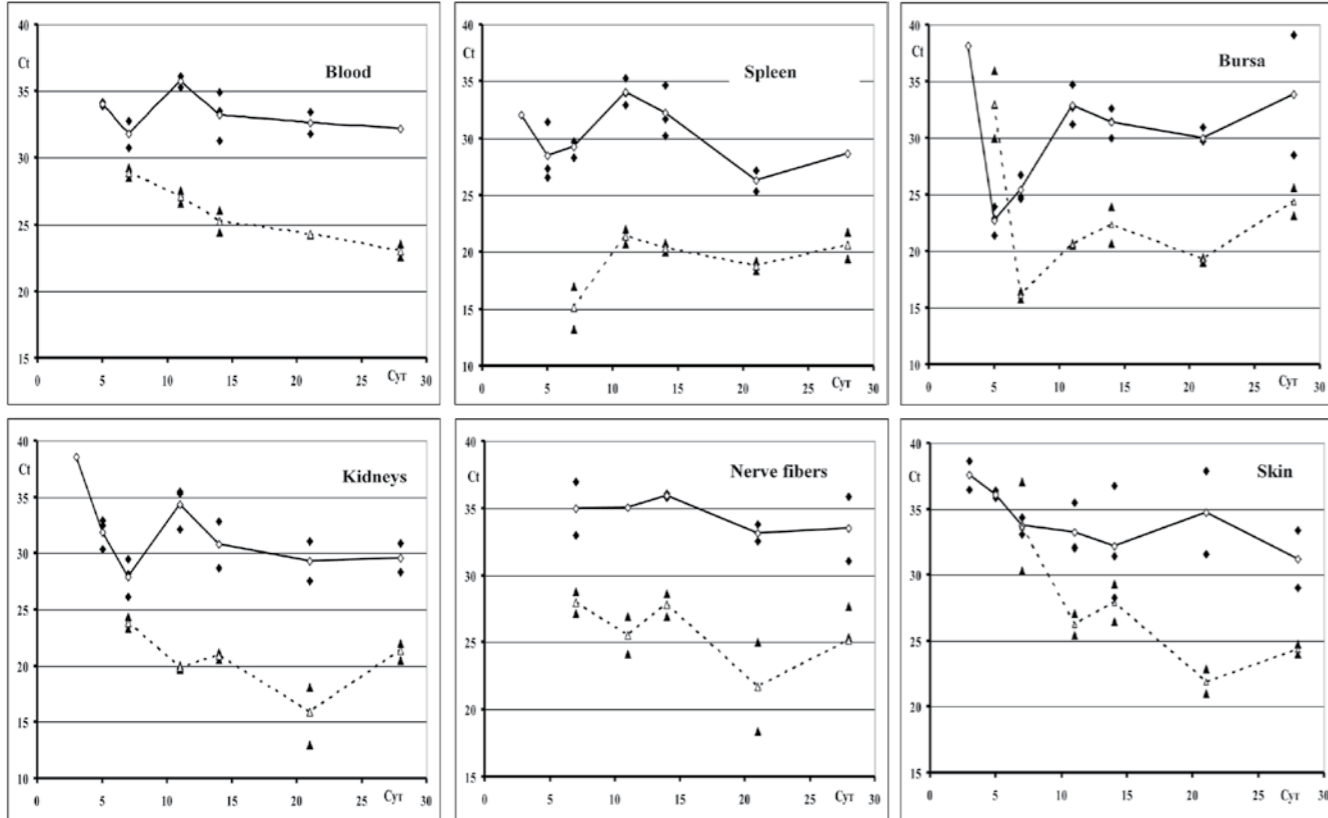


Fig. Number of amplification cycles (Ct) of primed genome segments of vaccine (◆) and virulent (▲) viruses determined by real-time PCR in tissues from different organs of chickens corresponding to time after inoculation (days). Distributions of mean Ct values (◇ and Δ) are given in the form of graphs.



УДК 619:578.831.1:578.72:616-079.4

И.П. Пчелкина<sup>1</sup>, С.Н. Колосов<sup>2</sup>, И.А. Чвала<sup>3</sup>, А.В. Андриясов<sup>4</sup>, А.С. Иголкин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>2</sup> главный научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>4</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>5</sup> заведующий аспирантурой, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

#### РЕЗЮМЕ

Представлены результаты молекулярно-вирусологического исследования методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием фрагмента гена F парамиксовируса птиц серотипа 1, выделенного в популяции водоплавающих диких птиц на озере Тагарское Красноярского края в 2011 году. Показано, что выявленные в этом регионе вирусы являлись только авирулентными вариантами вируса генотипа I класса II.

#### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

вирус ньюкаслской болезни, парамиксовирус птиц серотипа 1 (ПМВП-1), сайт расщепления белка F, вирулентность, филогенетический анализ, генотипирование.

#### ВВЕДЕНИЕ

Ньюкаслская болезнь (НБ) птиц относится к числу наиболее эпизоотологически и экономически значимых болезней птиц, поражающих мировое птицеводство и популяции многих диких видов. Распространение болезни обусловлено экономическими связями между странами, а также сезонными миграциями свободно живущих птиц.

Возбудителем НБ является парамиксовирус птиц серотипа 1 (ПМВП-1) или вирус ньюкаслской болезни (ВНБ), принадлежащий одному из девяти известных серотипов парамиксовирусов птиц рода Avulovirus семейства Paramyxoviridae [8].

Изоляты ВНБ делятся на три патотипа в зависимости от тяжести заболевания, вызываемого ими. Лентогенные изоляты ВНБ обычно не вызывают заболевания у взрослых птиц, считаются низко вирулентными и широко используются в качестве живых вакцин. Вирусы промежуточной вирулентности, которые вызывают респираторное заболевание, обычно не смертельное, называются мезогенными. Среди высоко вирулентных или везогенных изолятов ВНБ по всему миру наблюдаются висцеротропные и нейротропные формы [5].



Первичной молекулярной детерминантой вирулентности ВНБ является аминокислотная последовательность сайта расщепления белка F и способность определенных клеточных протеаз расщеплять белок F разных патотипов. В сайте расщепления белка F мезогенных и велогенных штаммов, как правило, присутствуют две пары двухосновных аминокислот (аргинин (R) или лизин (K)), окружающие глутамин в позиции 114, и фенилаланин (F) в позиции 117 (112R/K-R-Q-K/R-R-F117), тогда как белок F лентогенных изолятов ВНБ лишен такого мотива и несет лишь одиночные двухосновные аминокислоты (112G/E-K/R-Q-G/E-R-L117) [10]. Наличие парных основных аминокислот в последовательности белка F допускает системное распространение велогенного ВНБ, тогда как репликация лентогенного ВНБ ограничена главным образом тканями поверхности слизистых респираторной и желудочно-кишечных систем птиц.

Вирус ньюкаслской болезни обладает высоким уровнем генетического разнообразия, хотя в серологическом отношении считается, что все штаммы и изоляты этого патогена принадлежат одному серотипу. Выработана система классификации основных генетических линий вируса (генотипов). Имеется две большие группы (классы I и II), возникшие еще в первичном резервуаре вируса – на диких водных птицах [7]. Класс I делится на 9 генотипов, а класс II – на 10 крупных генотипов (I-X). Авирулентные вирусы встречаются только в генотипах I и II класса II и в классе I, которые циркулируют у диких птиц [4, 6, 7, 9, 13].

Вирус генотипа I класса II широко распространен по всему миру. Например, в Приморском крае частота встречаемости вируса генотипа I среди диких уток составляла относительно стабильную величину: 2,8-3,1% [1, 2]. Авирулентные вирусы класса II (генотипы I и II) также представлены несколькими лентогенными вакцинными штаммами (Ulster, Бор-74, PHU-LMV42, V4, La-Sota, Clon-30, B1). Остальные генотипы класса II (III-X) являются вирулентными по сайту расщепления вирусами.

Генетическая характеристика изолята вируса не только позволяет оценить его потенциальную вирулентность, но и идентифицировать его генотипическую принадлежность с точностью, достаточной для обоснованного заключения о наличии или отсутствии эпизоотологической связи между вспышками, их возможном происхождении и путях распространения ВНБ.

Несмотря на то, что в настоящее время имеются эффективные вакцины против ВНБ, эта инфекция остается одной из наиболее актуальных ветеринарных проблем современности. Спектр хозяев ВНБ чрезвычайно широк, чувствительными к вирусу в результате естественного или экспериментального заражения являются птицы более чем 250 видов. Природным резервуаром ВНБ являются дикие птицы как водного, так и наземного экологических комплексов. Из популяции диких птиц ВНБ проникает в среду домашних. Передача вируса происходит алиментарным и аэрогенным путями. В связи с этим изучение циркуляции ВНБ среди диких птиц имеет не только фундамен-

тальное, но и практическое значение. В данной работе представлены результаты исследования ВНБ среди водоплавающих диких птиц озера Тагарское Красноярского края в августе 2011 году.

Целью настоящей работы являлось изучение генетических характеристик и генотипической принадлежности изолятов ВНБ. Для этого были изучены нуклеотидные последовательности фрагмента гена F, включающего участок, кодирующий сайт расщепления белка слияния и являющийся генетической детерминантой вирулентности ВНБ. Определена потенциальная вирулентность и генотипическая принадлежность изолятов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе проведения научной работы и осуществления программ мониторинга за особо опасными заболеваниями птиц в Российской Федерации исследовался методом ОТ-ПЦР на наличие генома вируса ньюкаслской болезни патологический материал от водоплавающих диких птиц озера Тагарское Минусинского района Красноярского края, поступивший в августе 2011 года. Всего было исследовано 36 проб и было получено 4 ОТ-ПЦР положительных образца, из них 2 ВНБ было выделено в эмбрионах СПФ кур.

ПЦР-положительные образцы и изоляты. Список исследованных ПЦР-положительных образцов и изолятов и некоторые их характеристики приведены в таблице.

Выделение вируса. Выделение вируса проводилось согласно руководству МЭБ (O.I.E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 2009) в 9-11-суточных эмбрионах СПФ кур.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР проводились, как было описано ранее [3].

Секвенирование, генетический и филогенетический анализ. Реакцию секвенирования проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, США). Для секвенирования использовали набор BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Для удаления солей и несвязанных BigDye® терминаторов из реакционных секвенирующих смесей был использован набор BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystem).

Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей полученных фрагментов ДНК проводили, используя пакеты прикладных программ BioEdit, MEGA 4. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности вируса ньюкаслской болезни, опубликованных в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Дендрограмма получена методом NJ по фрагменту гена F (позиции 204-374) длиной 171 н.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Красноярский край расположен в основном в пределах Восточной Сибири, в бассейне реки Енисей. Общая численность озер в крае составляет 323 тысячи, или более 11 процентов от их числа в стране. В южной части края находится комплекс озер. Одно

из самых известных — озеро Тагарское. Физико-географические особенности региона создают условия для значительной плотности птиц водного комплекса с большим количеством молодых неиммунных особей из приплодов текущего года. Это приводит к высокой интенсивности межпопуляционных взаимодействий и резко повышает вероятность распространения инфекций, в том числе вызванных вирусом ньюкаслской болезни.

В ходе осуществления программ мониторинга за особо опасными заболеваниями птиц в Российской Федерации, в 2011 году было проведено эпизоотологическое обследование озера Тагарское, отобраны пробы материала от водоплавающих диких птиц для проведения вирусологических исследований. Методом ОТ-ПЦР РНК этого вируса была обнаружена в 4 пробах и методом секвенирования определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена F, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления белка F. Анализ аминокислотных последовательностей сайта протеолитического расщепления белка F позволил установить, что все исследованные варианты ВНБ слаботоногенны (авирулентны) с сайтом расщепления 112GKQGR-L117 (табл., рис. 1).

Филогенетический анализ позволил провести генотипирование исследованных изолятов с использованием последовательностей, опубликованных в работах Aldous и соавт. [4] и референтных последовательностей ВНБ, опубликованных в GenBank.

Изоляты Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11, Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11, Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11, Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11 принадлежат генотипу I класса II, к которому относятся ранние штаммы и многочисленные изоляты ВНБ, полученные по всему миру от диких водоплавающих птиц, представляющих естественный резервуар этого генотипа ПМВП-1.

Исследованные изоляты являются филогенетически близкими к изолятам, выделенным от уток в Приморском крае в 2001-2002 гг. (AY972102, AY972103), странах Дальнего Востока и Европы, и обладают сходством на 93-96% по изученному участку последовательности гена F с лентогенными и вакцинными штаммами «Ulster», «PHU-LMV42», «Бор-74» (рис. 2).

### Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в популяции диких уток озера Тагарское Красноярского края в 2011 году циркулировали авирулентные варианты ВНБ генотипа I класса II.

### Список литературы

1. Вирус болезни Ньюкасла в популяциях диких птиц на территории юга Приморского края в период осенних миграций 2001-2004 гг. / М.Ю. Щелканов, Е.В. Усачев, И.Т. Федякина [и др.] // Вопр. вирусол. – 2006. – № 4. – С. 37-41.
2. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края в 2003-2006 гг. / М.Ю. Щелканов, В.Ю. Ананьев, Д.Н. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. – 2007. – № 5. – С. 37-48.



ВНБ, выявленные от диких птиц Красноярского края в 2011 г.

№	Название изолята	Вид птицы	Сайт расщепления	Генотип
1	Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11	утка (чирок-свиистунок)	112 GKQGR-L <sup>117</sup>	I (выделен)
2	Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11	утка (чирок-свиистунок)	112 GKQGR-L <sup>117</sup>	I
3	Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11	утка (чирок-свиистунок)	112 GKQGR-L <sup>117</sup>	I (выделен)
4	Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11	утка (кряквa)	112 GKQGR-L <sup>117</sup>	I

```

112 117
...|...|...|...|...|...|...|...
Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11 DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG
Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11 DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG
Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11 DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG
Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11 DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG

```

Рис. 1. Аминокислотные последовательности сайта разрезания белка F в позиции 112-117 изолятов ВНБ



# AVIAN PARAMYXOVIRUS SEROTYPE-1

in wild bird population in the territory of Lake Tagarskoe,  
Krasnoyarsk Krai, in 2011

I.P. Pchelkina<sup>1</sup>, S.N. Kolosov<sup>2</sup>, I.A. Chvala<sup>3</sup>, A.V. Andryasov<sup>4</sup>, A.S. Igolkin<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir;

<sup>2</sup> Chief Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir;

<sup>3</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir;

<sup>4</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>5</sup> Head of Postgraduate Courses, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

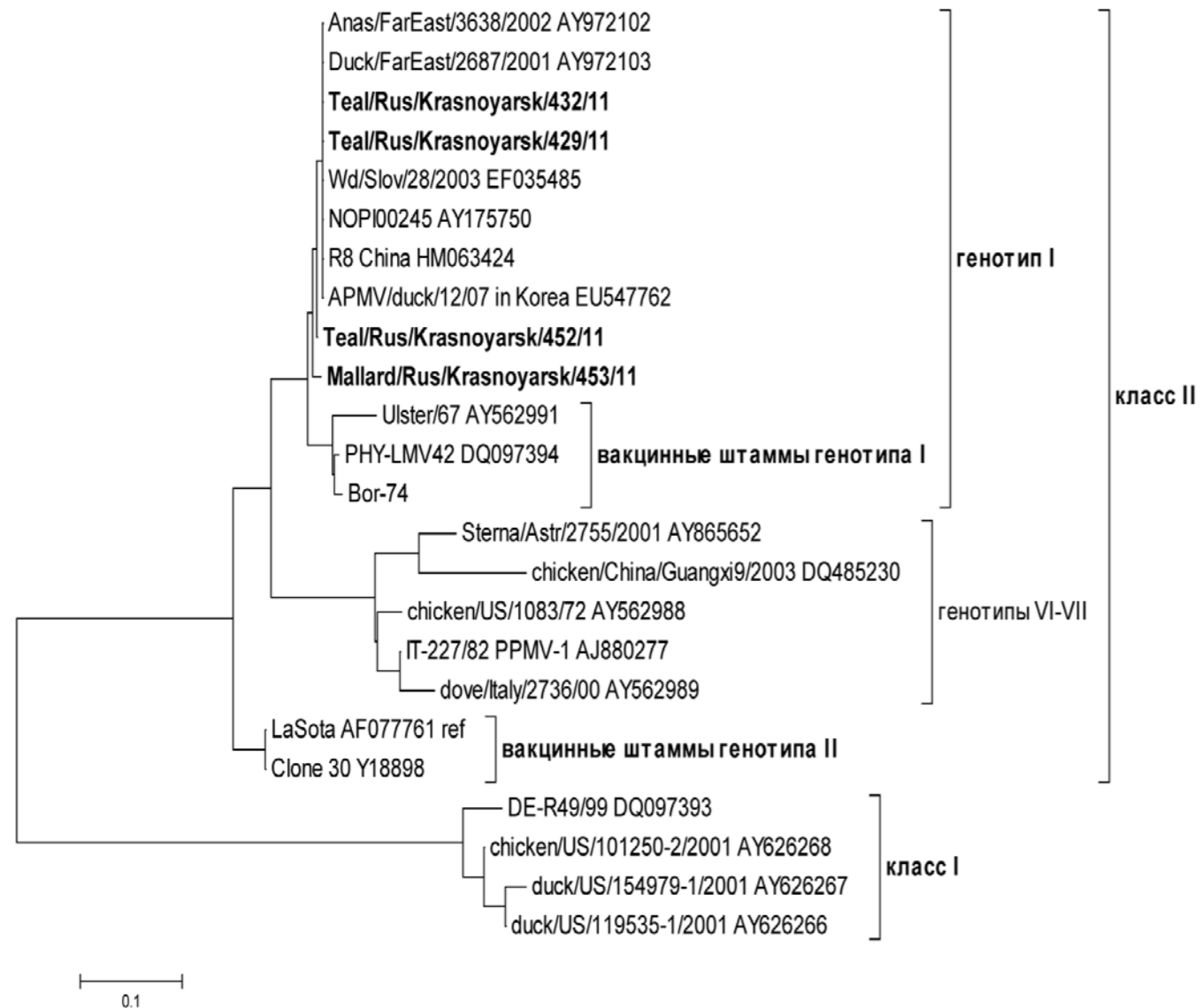


Рис. 2. Дендрограмма, демонстрирующая положение выделенных изолятов по отношению к существующим генотипам ВБН. Дендрограмма получена методом NJ по фрагменту гена F (204-374) длиной 171 н.

3. Определение генотипической принадлежности изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 году / И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин [и др.] // Вет. патология. – 2007. – № 4 (23). – С. 162-167.

4. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis a partial nucleotide sequence of fusion protein gene / E.W. Aldous, J.K. Mynn [et al.] // Avian Pathol. – 2003. – Vol. 32, № 3. – P. 239-257.

5. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections // Diseases of Poultry / ed. B.W. Calnek [et al.]. – 10th ed. – Ames, Iowa, 1997. – P. 541-570.

6. Herczeg J., Wehmann E., Bragg R.R. et al. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one(VIIb) of which reached Southern Europe // Arch. Virol. – 1999. – Vol. 144. – P.2087-2099.

7. Lomniczi B., Wehmann E., Herczeg J. et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) // Arch. Virol. – 1998. – Vol. 143. – P. 49-64.

8. Mayo M.A. Virus Taxonomy-Houston 2002 // Arch. Virol. – 2002. – Vol. 147. – P. 1071-1079.

9. Miller P.J., Decanini E.L., Afonso C.L. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // Infect. Genet. Evol. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 26-35.

10. Newcastle disease // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.15. – 5th ed. – Paris, 2004. – P. 270-282.

13. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications / A. Czegledi, D. Ujvari, E. Somogyi [et al.] // Virus Res. – 2006. – Vol. 120, № 1-2. – P. 36-48.

## SUMMARY

Results of molecular and virological investigation of avian paramyxovirus (APMV) serotype-1 isolated from wild waterfowl on Lake Tagarskoe, Krasnoyarsk Krai, with PR-PCR followed by sequencing of APMV F gene fragment are given. Viruses detected in this region are shown to be avirulent variants of the virus of class II genotype I.

**KEY WORDS:** Newcastle disease virus, avian paramyxovirus serotype-1 (APMV-1), F protein cleavage site, virulence, phylogenetic analysis, genotyping

## INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) is one of the major epidemiologically and economically important avian diseases affecting the world poultry industry and wild birds of many species. Economic relations between countries as well as season migrations of free-living birds contribute to the disease spread.

The ND is caused by avian paramyxovirus serotype-1 (APMV-1) or Newcastle disease virus (NDV) that belongs to one of nine known serotypes of paramyxoviruses of Avulovirus genus and Paramyxoviridae family [8].

NDV isolates are divided into three pathotypes depending on disease severity. Lentogenic NDV isolates generally do not cause disease in adult birds they are considered to be low virulent and widely used as live vaccines. NDV isolates of intermediate virulence cause respiratory primarily non-fatal disease and are called mesogenic. As for highly virulent or velogenic NDV isolates viscerotropic and neurotropic forms are found worldwide [5].

Primary molecular determinant for ND virus virulence is the amino acid sequence of F protein cleavage site and ability of certain cellular proteases to cleave F protein of different pathotypes. Two pairs of dibasic amino acids (arginine (R) and lysine (K) surrounding glutamine at position 114 and phenylalanine (F) at position 117 (112R/K-R-Q-K/R-R-F117) are generally present in the F protein cleavage site of mesogenic and velogenic strains while F protein of lentogenic NDV strains lacks this motif and contains only single dibasic amino acids (112G/E-K/R-Q-G/E-R-L117) [10]. Presence of paired basic amino acids in F protein sequence allows for systemic spread of velogenic NDV whereas replication of lentogenic NDV is largely limited to avian respiratory and gastrointestinal mucosal surface tissues.

ND virus is characterized by high genetic diversity while serologically all strains and isolates of this pathogen are considered to belong to one serotype. A system for classification of major genetic lines of the virus (genotypes) is developed. There are two large groups (class I and class II) that have emerged in the original virus reservoir, in wild waterfowl [7]. Class I is divided into 9 genotypes, class II is divided into 10 large genotypes (I-X). Avirulent viruses are present only in genotypes I and II of class II and in class I that circulate in wild birds [4, 6, 7, 9, 13].

Class II genotype I virus is wide-spread all over the world. For example, in the Primorsky Krai the frequency of genotype I virus occurrence in wild ducks is rather stable: 2.8 – 3.1% [1, 2]. Avirulent viruses of class II (genotypes I and II) also include some lentogenic vaccine strains (Ulster, Bor-74, PHY-LMV42, V4, La-Sota, Clon-30, B1). Other genotypes of class II (III-X) are virulent viruses according to the cleavage site.

Genetic characterization of virus isolate allows us to predict its virulence as well as to identify its genotype with the accuracy sufficient for making justified conclusion on presence or absence of an epidemiological link between outbreaks, their possible origin and routes of NDV spread.







Although there are efficient vaccines against Newcastle disease this infection remains one of the most important current problems in veterinary field. The range of NDV hosts is very wide more than 250 avian species are susceptible to natural or experimental virus infection. Both water and terrestrial wild birds are natural NDV reservoirs. NDV spreads from wild birds to poultry. The virus is transmitted alimentary and by air. Therefore, investigation of NDV circulation in wild birds is both of fundamental and practical importance. Results of NDV investigation in wild waterfowl on Lake Tagarskoe, Krasnoyarsk Krai, in August 2011 are presented in the paper.

The investigation was aimed at examination of genetic characteristics of NDV isolates and their genotyping. To this end, nucleotide sequences of F gene fragment including the region coding for fusion protein cleavage site and being genetic determinant for NDV virulence were examined. Potential virulence of the isolates was determined and they were genotyped.

### MATERIALS AND METHODS

Pathological materials from wild waterfowl on Lake Tagarskoe, Minusinsk Rayon, Krasnoyarsk Krai, submitted in August 2011 were tested by RT-PCR for genome of Newcastle disease virus in the framework of researches and programmes on highly dangerous avian diseases monitoring in the Russian Federation. A total of 36 samples were tested; 4 samples were found to be RT-PCR positive including 2 ND viruses that were isolated in SPF chicken embryos.

PCR-positive samples and isolates. A list of tested PCR-positive samples and isolates and some of their characteristics are given in the Table.

Virus isolation. Virus isolation was performed in 9-11 day-old SPF chicken embryos in accordance with the OIE Manual (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009)

RNA extraction and RT-PCR were carried out as described earlier [3].

Sequencing, genetic and phylogenetic analysis. Sequencing was performed using automated ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA). BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) was used for sequencing. BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) was used to remove salts and unbound BigDye® terminators from sequencing reaction mixtures.

Analysis of nucleotide and corresponding amino acid sequences of obtained DNA fragments was performed using BioEdit, MEGA 4 application program packages. Nucleotide sequences of Newcastle disease virus published in GenBank database were used for comparison (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dendrogram was constructed based on 171-nt fragment of F gene (positions 204-374) using NJ method.

### RESULTS AND DISCUSSION

The Krasnoyarsk Krai is located in Western Siberia, in the Yenisei River Basin. There are 323 lakes (more than 11% of total number of lakes in the country) in the Krai. There is a complex of lakes in the southern part of the Krai. Lake Tagarskoe is one of the most famous of them. Physical and geographical features of the region create conditions for habitation of significantly dense waterfowl populations including great numbers of young non-immune birds of current-year's offspring. This results in highly intensive interactions between populations



and drastically enhances the potential for the spread of infections including those caused by Newcastle disease virus.

Epidemiological survey in Lake Tagarskoe area was carried out in 2011 within the framework of implementation of programmes on monitoring of avian highly dangerous diseases in the Russian Federation; samples of pathological materials were collected from wild waterfowl for virological investigations. The virus RNA was detected with RT-PCR in 4 samples and nucleotide sequences of F gene fragment including nucleotide sequence encoding F protein cleavage site were determined by sequencing. Analysis of amino acid sequences of F protein proteolytic cleavage site showed that all tested NDV variants were low pathogenic (avirulent) and contained 112GKQGR-L117 cleavage site (See Table, Figure 1).

Phylogenetic analysis allowed genotyping of tested isolates to be carried out using sequences published by Aldous et al. [4] and NDV reference sequences from GenBank.

Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11, Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11, Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11, Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11 isolates belong to genotype I of class II that comprises early strains and multiple NDV isolates recovered worldwide from wild waterfowl that are natural reservoir of this APMV-1 genotype.

Tested isolates are phylogenetically close to isolates (AY972102, AY972103) recovered from ducks in the Primorsky Krai in 2001-2002, Far Eastern and European countries and have 93-96% similarity with lentogenic and vaccine strains (Ulster, PHY-LMV42, Bor-74) in examined site of F gene sequence (Fig. 2).

### CONCLUSION

Thus, the investigations showed that avirulent NDV variants belonging to class II genotype I circulated in the wild duck population on Lake Tagarskoe, Krasnoyarsk Krai, in 2011.

### REFERENCES

1. Newcastle disease virus in wild bird populations in the southern part of the Primorsky Krai during autumn migrations in 2001-2004 / M.Yu. Schelkanov, Te.V. Usachev, I.T. Fedyakina [et al.] // Voprosy virusologii – 2006 – No.4 – PP. 37-41.

#### ND viruses detected in wild birds in Krasnoyarsk Krai in 2011

Nº	Isolate name	Avian species	Cleavage site	Genotype
1	Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11	duck (teal)	<sup>112</sup> GKQGR-L <sup>117</sup>	I (isolated)
2	Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11	duck (teal)	<sup>112</sup> GKQGR-L <sup>117</sup>	I
3	Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11	duck (teal)	<sup>112</sup> GKQGR-L <sup>117</sup>	I (isolated)
4	Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11	duck (mallard)	<sup>112</sup> GKQGR-L <sup>117</sup>	I

```

                                     112  117
Teal/Rus/Krasnoyarsk/429/11  .....|.....|.....|.....|.....|.....
Teal/Rus/Krasnoyarsk/432/11  DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG
Teal/Rus/Krasnoyarsk/452/11  DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGG
Mallard/Rus/Krasnoyarsk/453/11 DSIRRIQESVTTSGGGKQGRLLIGAIIGS

```

Fig. 1. Amino acid sequences of F protein cleavage site (positions 112-117) of NDV isolates



2. Comprehensive ecologo-virological monitoring carried out into the territory of the Primorsky Krai in 2003-2006 / M.Yu. Schelkanov, V.Yu. Ananyev, D.N. Lvov [et al.] // *Voprosy virusologii.* – 2007. – No.5. – PP. 37-48.

3. Genotyping of Newcastle disease virus isolates recovered into the territory of the Russian Federation in 2006 / I.P. Pchelkina, S.N. Kolosov, T.B. Manin [et al.] // *Veterinarnaya patologiya* – 2007. – No. 4 (23). – PP. 162-167.

4. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of fusion protein gene / E.W. Aldous, J.K. Mynn [et al.] // *Avian Pathol.* – 2003. – Vol. 32, № 3. – P. 239-257.

5. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections // *Diseases of Poultry* / ed. B.W. Calnek [et al.]. – 10th ed. – Ames, Iowa, 1997. – P. 541-570.

6. Herczeg J., Wehmann E., Bragg R.R. et al. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa,

one(VIIb) of which reached Southern Europe // *Arch. Virol.* – 1999. – Vol. 144. – P.2087-2099.

7. Lomniczi B., Wehmann E., Herczeg J. et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) // *Arch. Virol.* – 1998. – Vol. 143. – P. 49-64.

8. Mayo M.A. Virus Taxonomy-Houston 2002 // *Arch. Virol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 1071-1079.

9. Miller P.J., Decanini E.L., Afonso C.L. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 26-35.

10. Newcastle disease // *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* Chapter 2.1.15. – 5th ed. – Paris, 2004. – P. 270-282.

13. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications / A. Czegledi, D. Ujvari, E. Somogyi [et al.] // *Virus Res.* – 2006. – Vol. 120, № 1-2. – P. 36-48.

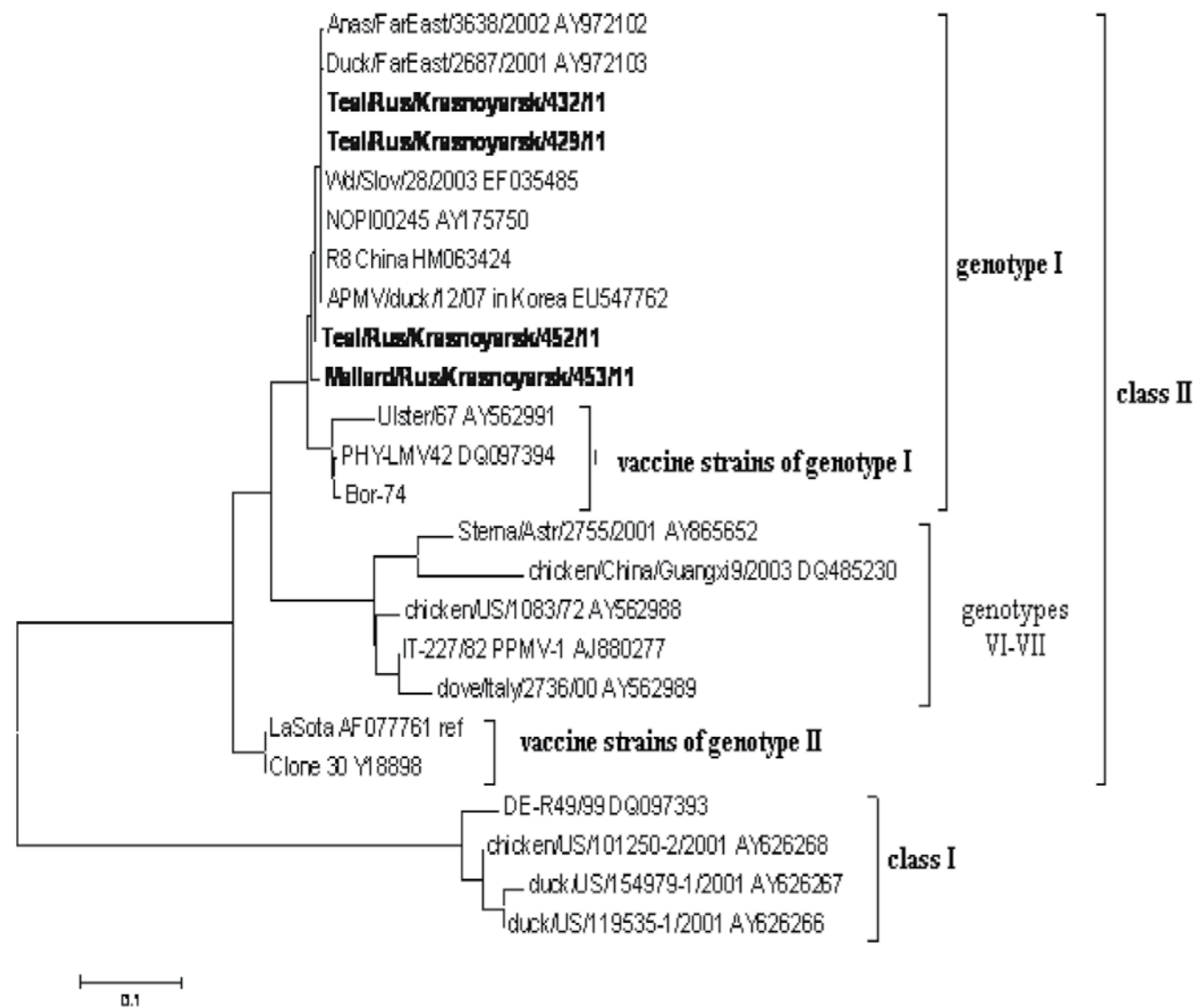


Fig. 2. Dendrogram shows position of recovered isolates as against to the existing NDV genotypes. The dendrogram is constructed based on 171nt-fragment of F gene (204-374) by NJ method

УДК 619:616.98:578.842.1:616-084

# РОЛЬ ДИКИХ КАБАНОВ В ЭПИЗООТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ АЧС В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Н.С. Бардина<sup>1</sup>, О.Н. Петрова<sup>2</sup>, А.В. Саввин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

## РЕЗЮМЕ

Опыт наблюдения за развитием эпизоотии африканской чумы свиней на территории стран, столкнувшихся с проблемой массового распространения заболевания и длительной борьбы с ним, свидетельствовал о существенной роли диких кабанов в этом процессе. То, что возбудитель африканской чумы свиней был занесен на территорию Российской Федерации дикими кабанями – неоспоримый факт. Однако, главенствующая роль этого фактора в дальнейшем распространении заболевания в стране сомнительна. Выяснение вклада популяции дикого кабана в эпизоотический процесс в России и изменение его с течением времени явилось целью этого исследования.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

африканская чума свиней, эпизоотия, дикие кабаны.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные МЭБ. В работе использованы сведения по вспышкам африканской чумы свиней, предоставленные Российской Федерацией в МЭБ [5].

Пакет прикладных программ Microsoft Excel. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel. Пространственно-географический анализ реализован в программной среде GIS - ESRI.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) был занесен на территории стран Закавказья в 2007 г. Заболевание впервые было зарегистрировано в домашней популяции в районе международного порта Потти (Грузия). Заболевание стало следствием скармливания необеззараженных пищевых отходов с кораблей, прибывших в порт (рис. 1.).

Первоначальная ошибочная диагностика (сначала у заболевших свиней диагностировали цирковирусную инфекцию) стала причиной неправильной организации противозооотических мероприятий, что привело к массовому распространению заболевания в Грузии, откуда оно было занесено в сопредельные страны, в т.ч. в Россию. Первый случай был выявлен в ноябре 2007 г. на территории Республики Чечня, куда африканская чума свиней была занесена с мигрирующими дикими кабанями (рис. 2).

Впоследствии (в 2007–2009 гг.) африканская чума свиней неоднократно регистрировалась у диких кабанов на территории Республик Чечня, Ингушетия, Кабардино-Балкария, Северная Осетия и Дагестан.

При этом в популяции домашних свиней на территории Республики Чечня заболевание ни разу не выявлялось. Возможно, это объясняется тем, что популяция свиней, здесь, чрезвычайно мала.

Учитывая принципы свиноводства в этих регионах, а именно – свободновыгульное содержание свиней, не ограничивающее их контакты с дикими кабанями, вероятность перехода инфекции из дикой фауны на домашнее поголовье практически неоспорима. Тот факт, что контакты диких и домашних свиней в республиках ничем не ограничивались, подтверждает большое количество поросят – «полосатиков». Кроме того, выгульные свиньи свободно питались на помойках, куда, в том числе,



выбрасывались пищевые и боенские отходы. Наибольшее распространение в домашней популяции АЧС получила в Республике Северная Осетия, что можно объяснить развитым свиноводством в данном регионе. Кроме того, существует определенная вероятность того, что птицы и животные могут способствовать распространению инфекции в качестве механических переносчиков.

Результатом ретроспективного анализа [2] эпизоотической ситуации по АЧС в РФ является пространственно-временная группировка вспышек заболевания, представленная на рис. 4. Очевидно, что имеются две отличные друг от друга тенденции распространения заболевания. Можно утверждать, что в период с 2007 по 2009 гг. это два малозависимых друг от друга процесса. Так, расширение эпизоотии среди домашних свиней направлено на северо-запад, что обусловлено, в первую очередь, развитой сетью автодорог, межхозяйственными связями и плотностью содержания свиней. Тенденция распространения АЧС среди диких кабанов приурочена к лесо-гористой местности близ кавказского хребта. В то же время имеется и северо-западный вектор (Ростовская область), что указывает на возможность формирования природных очагов заболевания в регионах, граничащих с центральной частью России.

Следует отметить, что кластерный анализ вспышек АЧС в популяциях домашних и диких свиней на 2012 г. указывает на кардинальное изменение ситуации, по сравнению с предыдущим периодом, и свидетельствует о существующей между ними связи.

Многие авторы утверждают, что основным источником заболевания в популяции домашних свиней являются кабаны. Это было верно в период 2007–2009 гг. для таких регионов страны, как Республики Чечня, Северная Осетия, Кабардино-Балкария и др., где практикуется свободновыгульное содержание свиней. Однако в последнее время наблюдается обратный процесс – переход АЧС с домашнего поголовья в дикую фауну, когда основным фактором в распространении инфекции являются т.н. инфицированные объекты, а именно, трупы павших от АЧС свиней, выбрасываемые хозяевами на свалки и в лесополосы, где они поедаются кабанами.

Таким образом, на данном этапе сходное направление эпизоотических процессов в обеих популяциях обусловлено в первую очередь хозяйственной деятельностью человека. Новые вспышки как у домашних свиней, так и в дикой фауне в основном связаны с неконтролируемым распространением свиноводческой продукции, пищевых и боенских отходов, а также отсутствием контроля за свалками. Так, в Ростовской, Волгоградской, Астраханской и Тверской областях АЧС поначалу регистрировалась только среди домашних свиней, и только спустя какое-то время стали выявляться случаи в дикой фауне. Например, в Ростовскую область заболевание было занесено в марте 2009 г., а первый случай падежа в популяции дикого кабана был зарегистрирован в марте 2010 г. Аналогичная

ситуация сложилась в Астраханской и Волгоградской областях, где случаи африканской чумы в дикой фауне стали регистрироваться спустя год после заноса возбудителя в популяцию домашних свиней.

На данном этапе развития эпизоотии в стране следует осуществлять продолжительное планомерное наблюдение за популяцией дикого кабана с целью оценки превалянтности и инцидентности болезни. В настоящее время систем мониторинга и наблюдения за африканской чумой свиней в дикой фауне РФ не существует. На необходимость разработки таких планов указывает и «Санитарный кодекс МЭБ». Согласно главе 15 Кодекса для признания страны, оздоровленной от АЧС, нужны доказательства отсутствия циркуляции вируса в популяции диких животных (по результатам мониторинга).

Говоря о депопуляции дикого кабана, следует отметить, что эффективность ее, как меры борьбы с АЧС, сомнительна. Замечено, что при отстреле кабаны массово мигрируют, и это только способствует распространению заболевания и проникновению его на новые территории. Для контроля ситуации по заболеванию гораздо предпочтительнее обеспечить нахождение популяции на одной территории, например, с помощью организации подкормочных площадок. В этом случае легко проследить за состоянием здоровья животных и контролировать изменение их численности. Это в свою очередь позволит на ранних этапах выявить заболевание и падеж животных.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдение за развитием эпизоотии африканской чумы свиней в Российской Федерации позволяет сделать следующие выводы:

1. Заболевание было занесено на территорию страны с дикими кабанами.
2. Нарушение ветеринарного законодательства, несвоевременность проведения противоэпизоотических мероприятий способство-



Рис.1. Первые вспышки АЧС на территории Грузии

Рис. 2. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Грузии в 2007 г.



Рис.3 Патологоанатомические изменения трупа кабана, являющиеся поводом для подозрения АЧС.

вали переходу заболевания на поголовье домашних свиней, что спровоцировало дальнейшую экспансию заболевания.

3. Бесхозяйственность и грубые нарушения ветеринарно-санитарных правил (в т.ч. правил утилизации пищевых отходов, продуктов убоя и трупов павших свиней) стали причиной заражения АЧС диких кабанов в Ростовской, Астраханской, Тверской, Волгоградской областях.

4. Поскольку кабаны в основном ведут оседлый образ жизни, не мигрируют, они не способны разносить заболевание на большие расстояния [4]. Кроме того, дикие кабаны не могут быть носителями возбудителя, т.к. АЧС протекает у них в острой форме со 100%-й летальностью через 5-14 суток после заражения. Очевидно, что больное животное не способно преодолевать большие расстояния.

5. Миграции кабана могут вызвать чрезвычайные факторы, такие как активный отстрел животных на определенных территориях, а также освобождение благоприятных для существования территорий (в случае гибели или отстрела предыдущих ее обитателей).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Особенности развития эпизоотии африканской чумы свиней в России / А.А. Шевцов, Н.С. Бардина, О.Н. Петрова, С.А. Дудников, А.В. Саввин // Ветеринария и кормление. – 2011. - № 3.-С. 13-15.
2. Методические указания по ретроспективному анализу эпизоотической ситуации (на примере отчетов об эпизоотической ситуации в Российской Федерации за год/полугодие/квартал) / О.Н. Петрова,

Н.С. Бардина, Е.Е. Ерастова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2011. - 51 с.

3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. - М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.

4. Майнхардт Х. Моя жизнь среди кабанов. – М.: Лесная промышленность, 1983. - 129 с.

5. URL: <http://web.oie.int/wahis/>.

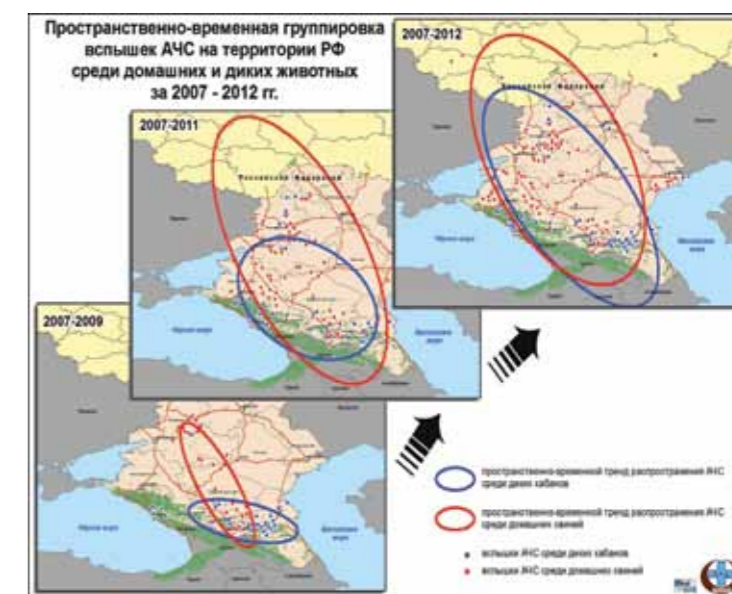


Рис.4. Пространственно-временная группировка вспышек АЧС на территории Российской Федерации



# THE ROLE OF WILD BOARS IN THE ASF EPIDEMIC PROCESS IN THE RUSSIAN FEDERATION

N.S. Bardina<sup>1</sup>, O.N. Petrova<sup>2</sup>, A.V. Savvin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>3</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

## SUMMARY

The experience in observation of African swine fever epidemic development in the territory of the countries facing the problem of mass spread and lasting control of this disease is indicative of a significant role of wild boars in this process. The fact that African swine fever agent was introduced into the territory of the Russian Federation by wild boars is undeniable. But the primary role of this factor in the further spread of the disease in the country is doubtful. The investigation of the wild boar population involvement in the epidemic process in Russia and its time progress were the purpose of this research.

**KEY WORDS:** African swine fever, epidemic, wild boars



## MATERIALS AND METHODS

The OIE data. The data on African swine fever outbreaks submitted by the Russian Federation to the OIE were used in the paper.

Microsoft Excel software package. The statistical processing of the results was carried out using Microsoft Excel standard software package. Spatial analysis was performed using GIS-ESRI software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The initial mistaken diagnosis (circovirus infection was diagnosed at first) resulted in improper anti-epidemic measures taken and that caused mass spread of the disease in Georgia. The disease was the result of feeding pigs with non-desinfected catering waste from ships arriving at the port (Fig. 1).

The initial mistaken diagnosis (circovirus infection was diagnosed at first) resulted in improper taken and that caused mass spread of the disease in Georgia. Then the disease was introduced into neighboring countries including Russia. The first ASF case was detected in November, 2007 in the Chechen Republic where it was brought with migrating wild boars (Fig. 2).

Afterwards (in 2007 – 2009) African swine fever was repeatedly reported in wild boars in the territory of the Chechen Republic, Ingooshetia, Kabardino-Balkaria, North Ossetia and Dagestan.

Herewith the disease was never detected in domestic pigs in the Chechen Republic. The possible explanation for this is that the domestic pig population in this republic is extremely small.

Taking into account the pig breeding principles in these regions, i.e. free ranging of pigs which does not restrict any contacts with wild boars the probability of the infection transfer from wild fauna to domestic population is practically undeniable. The fact that contacts between wild boars and domestic pigs in these republics were not restricted anyhow is confirmed by a large number of striped piglets. Besides free ranged pigs fed at dumps where catering and slaughter wastes were discarded as well. ASF was mostly spread in the North Ossetia and that could be explained by a developed pig breeding in this region. Besides birds and animals are likely to facilitate the spread of infection as mechanical vectors.



Figure 1. First ASF outbreaks in the Georgian territory



Figure 2. ASF epidemic situation in Georgia in 2007.

The result of retrospective analysis [2] of the ASF epidemic situation in the RF is the space-time clustering of the disease outbreaks shown in Fig. 4. Obviously there are two distinct trends of the disease spread. One may state that within the period from 2007 to 2009 they are two slightly cross related processes. The spread of the epidemic in domestic pigs is directed towards north-west which is conditioned first of all by a developed net of motor roads, interfarm relations and pig density. ASF spread trend in wild boars is associated with forest and mountain area in the vicinity of the Caucasian range. At the same time a north-western vector (the Rostov region) exists and this points to the possibility of natural focus formation in the regions bordering the central part of Russia.

It should be noted that cluster analysis of ASF outbreaks in populations of domestic pigs and wild boars for 2012 points to a fundamental change in the situation in comparison to the prior period and is indicative of the link existing between them.

Many authors state that the major source of the disease in the domestic pig population is wild boars. It was true in 2007-2009 for such regions as the Chechen Republic, North Ossetia, Kabardino-Balkaria and others where free ranging of pigs is practiced. But lately a reverse process has been observed: the ASF transfer from domestic population to wild fauna where the main factors of spread are the so called infected objects, i.e. carcasses of ASF affected pigs which were discarded by their owners to dumps or forests and eaten by wild boars.

Thus at this stage the compatible trend of epidemic processes in both populations is first of all conditioned by the economic activity of humans. New cases both in domestic pigs and in wild fauna are basically associated with an uncontrolled spread of pork products, catering and slaughter wastes as well as with a lack of control at dumps. For example in the Rostov, Volgograd, Astrakhan and Tver Regions ASF was at first registered only in domestic pigs and only some time later cases in wild fauna were reported. The disease was introduced to Rostov region in March, 2009, but the first death in wild boar population was registered in March, 2010. The similar situation was observed in the Astrakhan

and Volgograd Regions where African swine fever cases in wild fauna were registered a year later since its introduction into domestic pig population.

At this stage of the epidemic development it is necessary to carry out a continuous and systematic monitoring of wild boar population in the country aimed at the assessment of the disease prevalence and incidence. Nowadays no ASF monitoring and surveillance systems in wild fauna are in place in the Russian Federation. The necessity of such measures is stated by the OIE Terrestrial Code. According to Chapter 15 of the Code to acknowledge a country free from ASF it is necessary to prove that there is no ASFV circulation in wild pig population (based on monitoring results).

Regarding wild boar depopulation it should be noted that its efficiency in ASF control is doubtful. It was noted that during the shooting wild boars migrate in masses and this only facilitates the disease spread and its introduction to new territories. The measure of choice to control the disease is to ensure the location of a population in one territory for example by arranging feeding sites. In this case it is easy to keep a check on animal health condition and monitor changes in the number of animals. This will enable to identify the disease and mortality at an early stage.

## CONCLUSION

The observation of African swine fever epidemic development in the Russian Federation makes it possible to make the following conclusions:

1. The disease was introduced to the territory of the country by wild boars.
2. The violation of veterinary legislation, delay in anti-epidemic measures facilitated the disease transfer to domestic pig population and triggered the further disease expansion.
3. Mismanagement and gross violations of animal health rules (including rules of disposal of catering wastes, slaughter products and pig carcasses) were the cause of ASF infection of wild boars in the Rostov, Astrakhan, Tver and Volgograd Regions.
4. As wild boars are mostly sedentary and do not migrate they are not able to spread the disease for large





Figure 3. ASF in wild boar population (photos by A.V. Savvin and R.K. Ozdemirov)

distances [4]. Besides wild boars can not be the disease carriers because they have an acute form of ASF with 100% mortality 5 – 14 days post infection. It is obvious that an affected animal can not cover large distances.

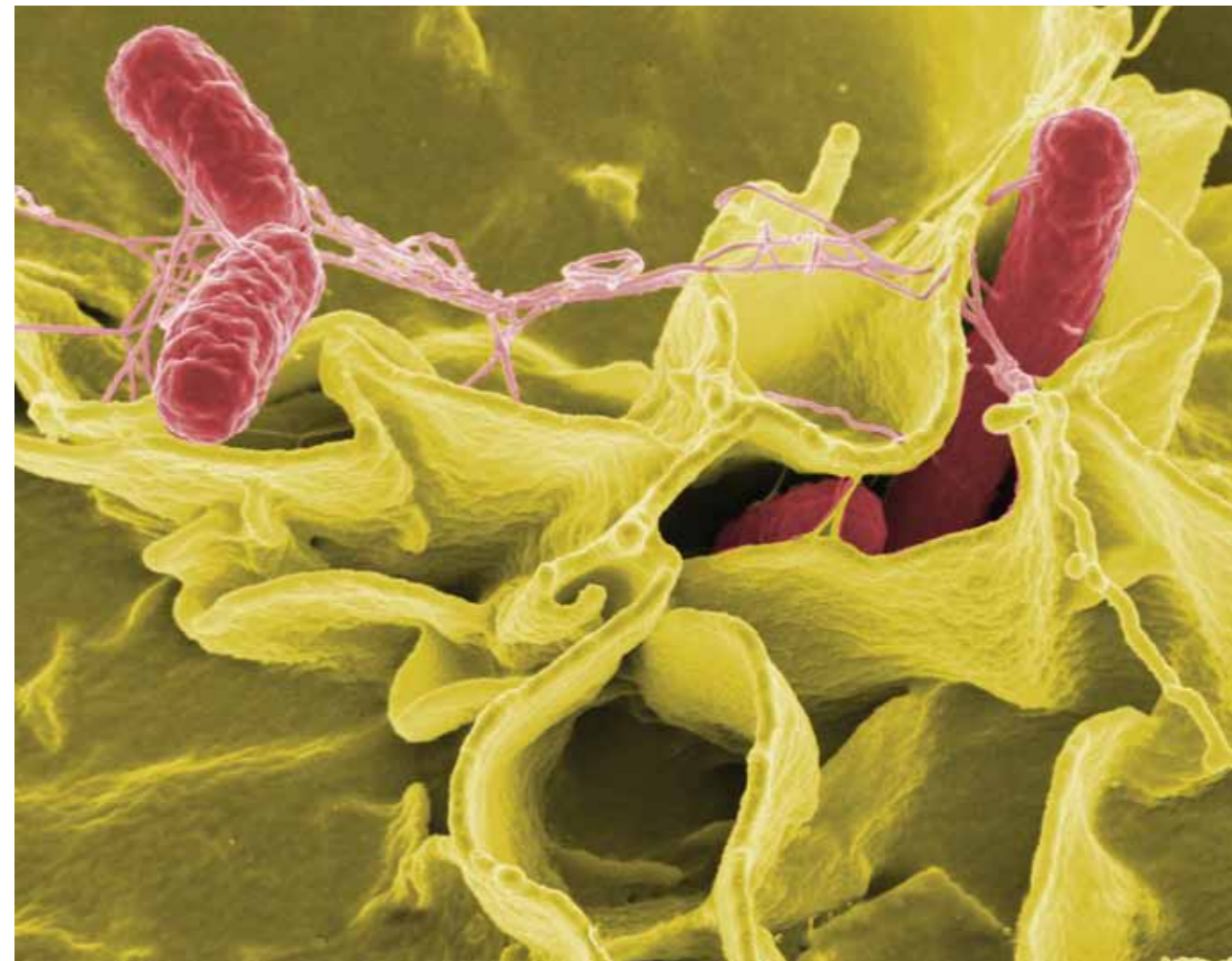
5. Wild boar migrations can be forced by such extraordinary factors as shooting of animals in definite territories and vacation of territories favorable for living (in case of death or shooting of previous inhabitants).

#### REFERENCES

1. The peculiarities of African swine fever epidemic development in Russia /A.A. Shevtsov, N.S. Bardina, O.N. Petrova, S.A. Dudnikov, A.V. Savvin // Veterinariya i Kormleniye. – 2011. # 3.-p.13 – 15.
2. Methodical instructions for retrospective analysis of epidemic situation (based on epidemic situation reports in the Russian Federation for a year/six months/quarter) / O.N. Petrova, N.S. Bardina, Ye.Ye. Yerastova [and others]; FGBI "ARRIAH" – Vladimir, 2011. – p.51
3. Animal viral diseases / B.N. Syurin, A.Ya. Samuilenko, B.V. Solovyov, N.V. Fomina. – M.: VNITIBP, 1998. – p.928
4. Meinhardt H. My life among wild boar. M.: Lesnaya Promishlennost 1983.- p. 129.
5. URL: <http://web.oie.int/wahis/>.



Figure 4. Space-time clustering of ASF outbreaks in the territory of the Russian Federation



УДК 619:641-02:579.67

## О РЕЗУЛЬТАТАХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

**Н.Б. Шадрова**

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

#### РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты микробиологического исследования продуктов животного происхождения за 2010 г.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:**  
пищевая безопасность,  
микробиологические исследования.

#### ВВЕДЕНИЕ

Микробиологические исследования входят в систему мер по обеспечению безопасности пищевых продуктов. Качество и безопасность продукции животного происхождения во многом определяют здоровье и продолжительность жизни населения страны.

В настоящее время известно около 200 болезней, передаваемых человеку через пищевые продукты, среди них 18 видов бактерий, которые являются причиной наиболее распространенных пищевых отравлений [2]. Так, в России в 2008 году, по данным Центральной научно-методической





ветеринарной лаборатории, было исследовано 1,8 млн. образцов продукции животного происхождения. Количество положительных результатов составило 10,4%. При этом было выявлено 1346 партий продукции, не соответствующих требованиям безопасности по содержанию сальмонелл [1].

Современная ситуация, связанная с расширением международной торговли продукцией животного происхождения, изменение окружающей среды, приводящее к появлению новых свойств у микроорганизмов, расширение сети общественного питания, новые приемы приготовления пищи являются основными факторами, способствующими распространению пи-

щевых инфекций и интоксикаций [2]. В этих условиях роль ветеринарно-санитарной экспертизы в целом, и бактериологических исследований в частности, трудно переоценить.

Микробиологические исследования как средство контроля численности микроорганизмов и безопасности пищевых продуктов проводятся не один десяток лет, на их основе разрабатываются рекомендации, рецептура продуктов и нормативные акты. Благодаря последним достижениям науки и практики и постепенному внедрению профилактического подхода к контролю пищевой безопасности роль микробиологического контроля еще более возросла [3].

Целью данной работы было изучение структуры исследуемых проб пищевой продукции для выявления групп продуктов, которые не соответствуют установленным нормам по микробиологическим показателям.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологические исследования проводились в лаборатории микробиологии кормов и продуктов питания ФГУ «ВНИИЗЖ» в соответствии с существующими инструкциями, нормами и методиками: СанПиН 2.3.2.1078-01, ГОСТ Р 52814-2007, ГОСТ Р 52816-2007, ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ Р 51921-2002, ГОСТ 29185-91, ГОСТ 10444.2-94, ГОСТ 10444.12-88.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За 12 месяцев 2010 г. всего было проведено 3200 исследований пищевых продуктов. Наибольшие объемы проведенных исследований отмечались по

группам «Говядина» – 28,8%, «Свинина» – 20%, «Молоко и молочная продукция» – 16,9%.

В результате бактериологического исследования (таблица) было установлено, что наибольший процент положительных проб (17,8%), не соответствующих установленным нормам, обнаружен в группе мясных полуфабрикатов. Контаминация бактериями рода *Salmonella* составила 23,1%, бактериями группы кишечной палочки (БГКП) – 20,0%, превышение допустимого количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) – 30,1%. Плесени в мясных полуфабрикатах обнаружили в 6 пробах из 37, что составило 16,2%. Кроме того, однократно были выявлены бактерии *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*.

Анализ микробиологических показателей санитарного состояния молока позволяет заключить, что наибольший процент несоответствия приходится на показатель КМАФАнМ – 21,1%, кроме того, в молочной продукции были обнаружены БГКП – 14,8%.

При исследовании мяса птицы установлено превышение общего уровня бактериальной обсемененности в 9,4% случаях.

В говядине обнаруживали несоответствие по показателю КМАФАнМ – 5,6%, и по БГКП – 1,3%.

При анализе положительных проб (рисунок) было установлено, что наибольшая доля несоответствия установленным нормам приходится на показатель КМАФАнМ – 67%, далее следуют БГКП – 16,3%, бактерии рода *Salmonella* – 11%, плесневые грибы – 3,9%, *Listeria monocytogenes* – 1,3% и *Staphylococcus aureus* – 0,5%.

### ВЫВОДЫ

В ходе проведенных исследований установлено, что группа пищевых продуктов, которая представлена



мясными полуфабрикатами, «лидирует» по несоответствию существующим микробиологическим нормам и, соответственно, является потенциально наиболее опасной в плане появления пищевых инфекций и отравлений.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калмыков М.В., Белоусов В.И., Иванова Г.В. Лабораторный контроль безопасности продуктов животного происхождения и кормов в Российской Федерации // Ветеринария. – 2010. - № 3. – С. 3-6.
2. Куликовский А.В. Безопасность продукции животного происхождения // Практик. – 2010. - № 3. – С. 25-31.
3. Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яиц / Под ред. Дж.К. Мида. – СПб.: Профессия, 2008. – 383 с.

### РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ЗА 2010 Г.

Вид продукции	Кол-во исследований, всего/положительные	Положительные исследования, %	Наименование микробиологических показателей по СанПиН 2.3.2.1078-01						
			КМАФАнМ	БГКП	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Клостридии	<i>S. aureus</i>	Плесени
Свинина	640/10	1,6	148/5	148/3	172/2	172/0	н/и	н/и	н/и
Субпродукты свиные	260/1	0,4	н/и	н/и	130/1	130/0	н/и	н/и	н/и
Говядина	923/20	2,2	299/16	298/4	163/0	163/0	н/и	н/и	н/и
Субпродукты говяжьи	246/2	0,8	н/и	н/и	123/1	123/1	н/и	н/и	н/и
Полуфабрикаты мясные	309/55	17,8	73/22	65/13	52/12	74/1	н/и	8/1	37/6
Мясо птицы	64/4	6,3	32/3	н/и	32/1	32/0	н/и	н/и	н/и
Готовая мясная продукция	216/5	2,3	43/4	43/1	14/0	30/0	43/0	43/0	н/и
Молоко и молочная продукция	541/56	10,4	246/52	27/4	246/0	7/0	н/и	15/0	н/и

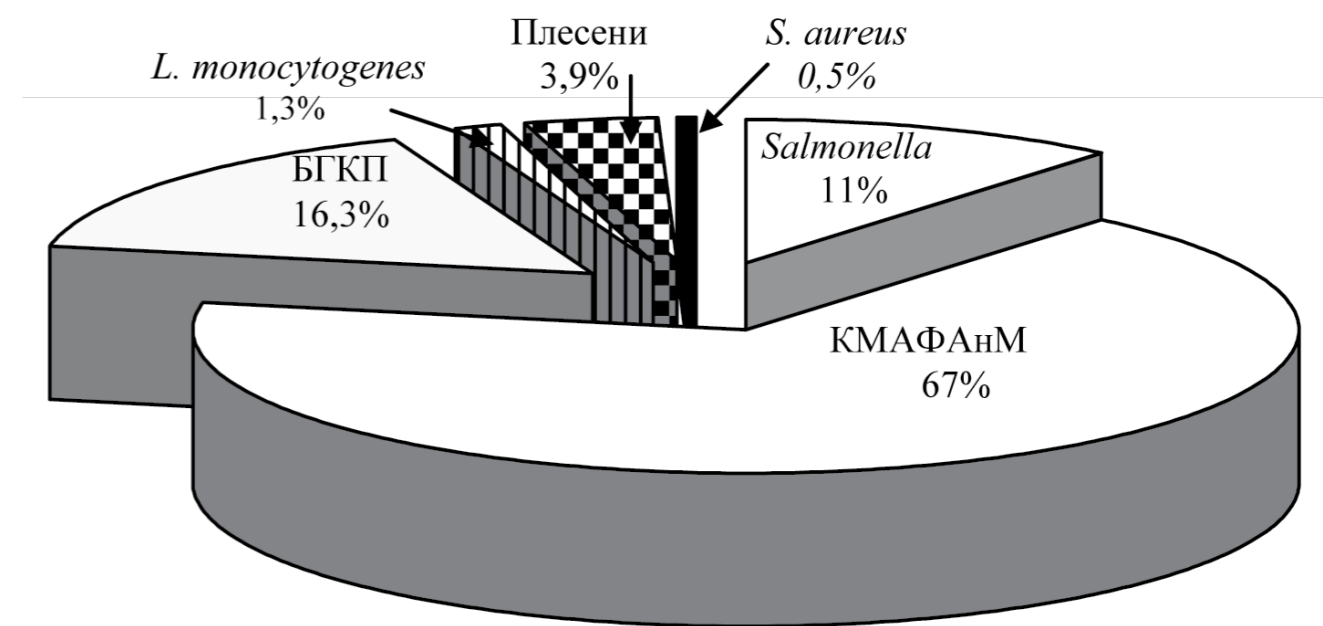


Рис. Распределение положительных проб





UDK 619:641-02:579.67

# RESULTS OF MICROBIOLOGICAL TESTING OF FOOD PRODUCTS

**N.B. Shadrova**  
Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

**SUMMARY**  
Results of microbiological testing of animal-derived food products are demonstrated in the paper.

**KEY WORDS:** food safety, microbiological testing

## INTRODUCTION

Microbiological testing is among measures taken for food safety. Quality and safety of animal-derived food products to a large extent precondition health and live duration of the human population.

Currently about 200 food-borne diseases are known including 18 bacteria, which are the cause of the most spread food intoxications [2]. Thus according to the data from the Central Scientific and Methodical Veterinary Laboratory 1.8 million samples of animal-derived food products were tested during 2008 in Russia. Positive results amounted to 10.4%. Herewith 1346 product consignments were identified, which were not compliant with the safety requirements as for salmonella [11].

Current situation resulting from the continuous expansion of international trade with animal products as well as environmental changes leading to the emergence of new properties of microorganisms, extension of public catering network and new approaches to cooking are the main factors aiding to the spread of food-borne infections and intoxications [2]. Under such circumstances it is hard to overestimate the role of animal health expertise at large and of bacteriological tests in particular.

Microbiological tests as a tool for monitoring of microorganism population and food safety have been used for more than one decade; recommendations, product formulations and regulations have been developed on their base. Due to the latest scientific and practical achievements as well as due to the introduction of preventive approach to food safety monitoring the role of microbiological monitoring has increased even more.

The paper is aimed at examination of the structure of investigated food samples, which are non compliant with current regulations in terms of microbiological criteria.

## MATERIALS AND METHODS

Microbiological tests were performed in the Laboratory for Microbiology of Feed and Food of the FGBI "ARRIAH" according to current instructions, regulations and methods: SanPin 2.3.2.1078-1, GOST R 52814-2007, GOST R 52816-2007, GOST 10444.15-94, GOST R 51921-2002, GOST 29185-91, GOST 10444.2-94, GOST 10444.12-88.

## RESULTS AND DISCUSSION

During 12 months of 2010, total of 3200 tests of food products were performed. The highest number of tests



was carried out for the following categories: "Beef" – 28.8%, "Pork" – 20%, "Milk and dairy products" – 16.9%.

Bacteriological test results (see Table) demonstrated the highest number of non-compliant positive samples (17.8%) in the category of meat products. Salmonella sp. contamination amounted to 23.1%, coliforms – 20.0%, exceeding of allowable level of aerobic mesophilic microorganisms and facultative anaerobic microorganisms (QMAFAnM) amounted to 30.1%. In 6 samples out of 37 ones mold was detected that amounted to 16.2%. In addition, single cases of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus were detected.

Microbiological analysis of milk sanitary quality is suggestive of the higher proportion of non-compliances to be accounted for QMAFAnM (21.1%). In addition,

## RESULTS OF MICROBIOLOGICAL TESTS OF FOOD PRODUCTS IN 2010

Type of product	Number of tests, total/positive	Positive results, %	Наименование микробиологических показателей по СанПиН 2.3.2.1078-01						
			QMAFAnM	Coliform	Salmonella	L. monocytogenes	Clostridia	S. aureus	Molds
Pork	640/10	1,6	148/5	148/3	172/2	172/0	n/t	n/t	n/t
Pig offal	260/1	0,4	n/t	n/t	130/1	130/0	n/t	n/t	n/t
Beef	923/20	2,2	299/16	298/4	163/0	163/0	n/t	n/t	n/t
Beef offal	246/2	0,8	n/t	n/t	123/1	123/1	n/t	n/t	n/t
Semifinished meat	309/55	17,8	73/22	65/13	52/12	74/1	n/t	8/1	37/6
Poultry meat	64/4	6,3	32/3	n/t	32/1	32/0	n/t	n/t	n/t
Ready-to-eat meat products	216/5	2,3	43/4	43/1	14/0	30/0	43/0	43/0	n/t
Milk and dairy products	541/56	10,4	246/52	27/4	246/0	7/0	n/t	15/0	n/t





coliforms were detected in dairy products (14.8%).

Poultry meat tests demonstrated the excess of total bacterial count in 9.4% of cases.

Beef tests are indicative of non-compliance of QMAFAnM values in 5.6% of cases and of coliform level in 1.3% of cases.

Analysis of positive samples (see the diagram) indicated the highest proportion of non-compliances with set requirements to be accounted for QMAFAnM (67%) followed by coliforms (16.3%), *Salmonella* sp. (11%), molds (3.9%), *Listeria monocytogenes* (1.3%) and *Staphylococcus aureus* (0.5%).

### CONCLUSIONS

The performed tests demonstrated that food products represented by meat semiproducts are the "leader" in non-compliances with microbiological standards and therefore potentially they are the most hazardous products in respect of foodborne infections and intoxications.

### REFERENCES

1. Kalmykov M.V., Belousov V.I., Ivanova G.V. Laboratory monitoring of animal food and feed safety in the Russian Federation // Veterinaria. – 2010. – No. 3. – С.25-31
2. Kulikovskiy A.V., Animal food safety // Praktik. – 2010. – No. 3. – С.25-31
3. Microbiological analysis of red meat, poultry meat and egg products / edited by J.K. Meade – SPb.: Profesiya, 2008. – 383 s.

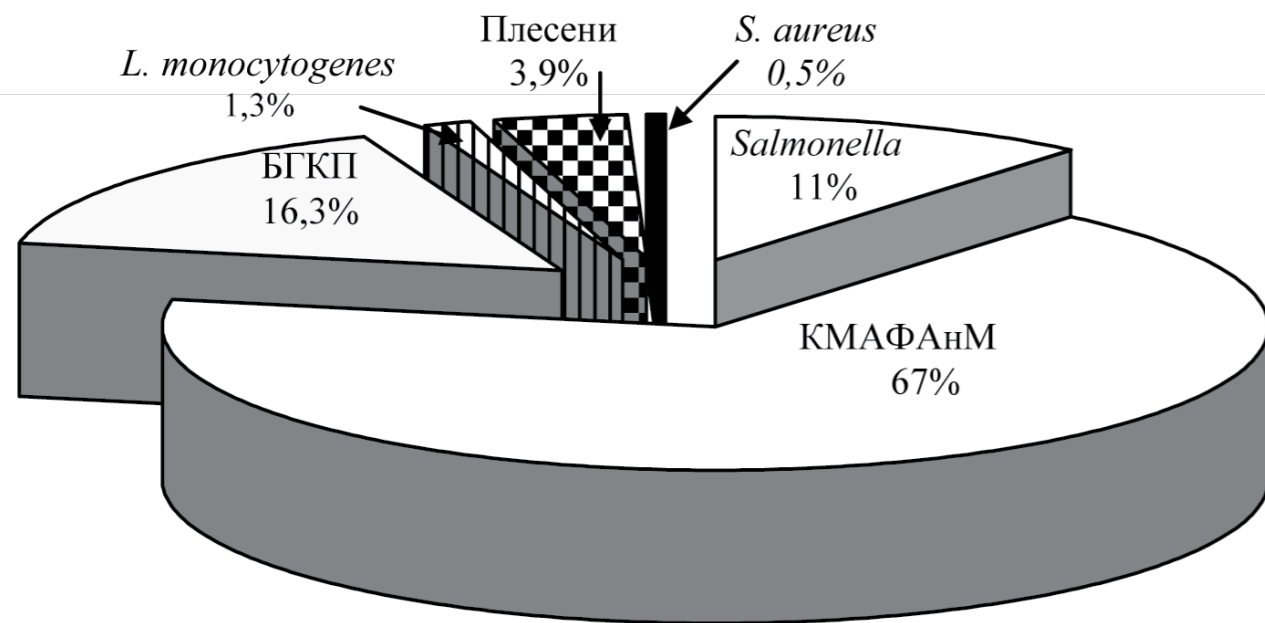


Diagram: Positive sample fragmentation

# РЕГЛАМЕНТИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭМБРИОН-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ПТИЦ ИЗ ШТАММА «КЭМ-7» С РАЗБАВИТЕЛЕМ

С.А. Похвальный<sup>1</sup>, В.Ю. Кулаков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ведущий ветеринарный врач ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>2</sup>ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

### РЕЗЮМЕ

Экспериментально обоснованы основные технологические показатели эмбрион-вакцины против оспы птиц из штамма «КЭМ-7» с разбавителем: объем фасовки эмбрион-вакцины и разбавителя, минимальный инфекционный титр вакцины в зависимости от количества доз во флаконе. Определено допустимое время сохранения биологической активности данной вакцины, ресуспендированной в разбавителе.

It has been grounded experimentally basic technological indicators of avian embryo vaccine with fowlpox virus strain "KEM-7" with diluent. Permissible time of conservation of the biological activity of this vaccine reconstituted in diluent was determined.

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

эмбрион-вакцина против оспы птиц с разбавителем, двухигольный инъектор, объем смачивания иглы, прививной объем вакцины.

### ВВЕДЕНИЕ

При специфической профилактике оспы птиц метод интрадермальной инъекции вирусного материала имеет наибольший иммунизирующий эффект по сравнению с окулярным, пероральным и аэрозольным способами инокуляции [4, 5, 6]. Накожное нанесение вирусного материала в оголенные перьевые фолликулы кожи в области внутренней поверхности бедра создает напряженный иммунный ответ, но при этом является длительным и трудоемким [1, 2].

Для интрадермальной инъекции обычно используют двухигольный инъектор. В этом случае процедура инъекции заключается в смачивании иглы инъектора в ресуспендированной вакцине и прокалывании бесперьевого участка перепонки крыла птиц. Таким образом, производят внутрикожную инокуляцию вирусного материала, находящегося на поверхности иглы.

В момент прокалывания кожи происходят механические потери вакцины, поэтому величины объема смачивания иглы и прививного объема различаются. Кроме этого, существенное значение имеют диаметр иглы и глубина погружения их в жидкую форму вакцины. Перечисленные параметры определяют необходимый уровень биологической активности вакцины и ее расход при иммунизации.

Цель настоящей работы состояла в экспериментальной оценке и обосновании следующих технологических характеристик данной эмбрион-вакцины: объема смачивания иглы инъектора, прививного объема вакцины, объема фасовки разбавителя и вакцины, числа прививных доз во флаконе, величины исходной инфекционной активности вакцины и допустимого времени ее сохранения в суспензии в разбавителе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцина. Эмбрион-вакцина против оспы птиц из штамма «КЭМ-7», представляющая собой лиофилизированный гомогенат вирусосодержащей ткани хориоаллантоисных оболочек СПФ-эмбрионов кур с добавлением стабилизатора (экспериментальная серия №3). Величина прививной дозы 1000 ЭИД<sub>50</sub> [3].

Разбавитель для вакцины. Изотонический фосфатно-буферный раствор Дульбекко с добавлением глицерина (рН 6,8-7,4).

Двухигольный инъектор. Стандартный инъектор для интрадермальных прививок, представляющий собой систему из двух швейных игл №110 (0046-02), укрепленных параллельно в держателе на расстоянии 4 мм и имеющих длину h=30 мм.

Подопытная птица. Клинически здоровые цыплята кросса «Хайсекс белый», не иммунные к оспе птиц в возрасте 25-45 сут.

Эмбрионы кур. В опытах были использованы эмбрионы кур категории SPF (Specific Pathogen Free) 10-суточной инкубации. Инкубирование проводили при температуре (37,0±0,5)°С и относительной влажности 75-80%. Эмбрионы заражали на хориоаллантоисную оболочку (ХАО) в искусственной воздушной камере.





Определение инфекционного титра вируса на эмбрионах и птицах. Титрование проводили по методу последовательных десятикратных разведений вирусного материала. Каждое разведение (дозу) испытывали на 6 тест-объектах, в группе которых определяли долю положительных реакций. Положительной реакцией считали вирусспецифические пролиферативно-некротические образования на ХАО. Величину титра вируса вычисляли по методу Кербера.

Статистическая обработка результатов. Использовали общепринятые методы определения дисперсий, стандартных ошибок и существенности различий средних значений варьирующих переменных. Для вычислительных операций использовали программу Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение объема смачивания игл инъектора. Объем смачивания игл инъектора вычисляли по остатку ресуспендированной вакцины во флаконе после заданного числа инъекций. Для этого измеряли

#### Результаты определения объема смачивания игл инъектора и прививного объема вакцины

№ опыта	Объем смачивания игл, мкл	Прививной объем вакцины, мкл
1	5,872	3,54
2	7,059	4,32
3	5,589	3,42
4	6,695	3,75
5	6,723	4,08
6	6,368	3,63
Средние значения (x±m)	6,38±0,23	3,79±0,14

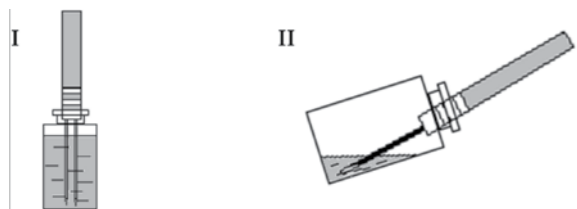


Рис. 1. Положение инъектора и флакона в начальной (I) и конечной (II) стадии расходования вакцины

массу пустого флакона, массу флакона с ресуспендированной вакциной объемом 5 см<sup>3</sup> (m<sub>1</sub>), и затем вычисляли массу 1 мкл ресуспендированной вакцины (m<sub>2</sub>).

Затем производили имитацию инъекций (n-число раз) путем погружения игл инъектора на 2/3h во флакон с ресуспендированной вакциной и прокола конструкции, состоящей из 3 слоев фильтровальной бумаги. Далее измеряли массу флакона с вакциной после имитаций инъекций (m<sub>3</sub>) и определяли объем смачивания игл инъектора (V<sub>w</sub>) по формуле:

$$V_w = (m_1 - m_3) / (m_2 \times n)$$

Измерение V<sub>w</sub> проводили в нескольких повторностях (см. табл. 1).

Определение прививного объема вакцины. Прививной объем (V<sub>in</sub>) определяли по соотношению величин инфекционного титра вакцины (T<sub>i</sub>), полученного при интрадермальной инъекции в перепонку крыла цыплят фиксированного объема препарата (V<sub>f</sub>) с помощью инсулинового шприца и титра (T<sub>in</sub>), установленного при интрадермальной инъекции этого же препарата двухигольным инъектором. Положительной реакцией птиц на инъекцию считали характерные для оспы признаки местного воспаления. Наблюдение за состоянием птиц вели в течение 14 сут.

Расчет искомой величины прививного объема (V<sub>in</sub>) производили по формуле:

$$\lg V_{in} = \lg T_{in} + \lg V_f - \lg T_i$$

Измерение V<sub>in</sub> проводили в нескольких повторностях (см. табл. 1).

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что объем внутрикожной прививки (V<sub>in</sub> = 3,79±0,14) существенно отличался (p≤0,001) от объема смачивания игл (V<sub>w</sub> = 6,38±0,23).

В практическом аспекте это означает, что объем препарата, который остается на поверхности игл после погружения инъектора в содержимое флакона, превосходит величину прививаемого объема. Расход вакцины определяется величиной объема смачивания игл, а минимальный уровень инфекционной активности вакцины – величиной прививного объема.

Учитывая статистику проведенных измерений и ориентируясь на более надежные технологические показатели, считали целесообразным принять в качестве ожидаемой оценки объема смачивания верхнюю границу доверительного интервала (p≤0,05) средней величины, которая приблизительно составила значение 7 мкл. При этом ожидаемой оценкой объема внутрикожной прививки считать приближенное среднее значение, равное 4 мкл.

Установление инфекционной активности вируса, объема фасовки эмбрион-вакцины и разбавителя в зависимости от количества прививных доз во флаконе. Для получения необходимой прививной иммунизирующей дозы глубина погружения игл инъектора в вакцину должна составлять 2/3h. С этой целью по мере уменьшения объема вакцины положение флакона необходимо изменять (рис. 1).

Для того чтобы степень смачивания игл была постоянной (в т.ч. при уменьшении общего количества вакцины и в наклонном положении флакона), количество препарата во флаконе должно иметь дополнительный объем, который составляет приблизительно 1,5 см<sup>3</sup>. Данный объем ресуспендированной вакцины не используется и подлежит обеззараживанию.

На основании рассчитанных величин были определены основные технологические характеристики предлагаемого варианта эмбрион-вакцины против оспы птиц из штамма «КЭМ-7». Варианты фасовки эмбрион-вакцины и разбавителя, а также минимальный инфекционный титр вируса в лиофилизированном материале представлены в табл. 2.

Определение допустимого времени сохранения биологической активности вакцины, ресуспендированной в разбавителе. Проводили титрование на СПФ-эмбрионах кур сразу после разведения и через 2, 3, 4, 5, 6, 8 и 10 часов экспозиции. Экспозицию разведенной вакцины проводили в термостате при температуре (37,0±0,5)°C, имитируя при этом нахождение флакона с вакциной в руке вакциниатора.

На основании полученных данных по титрованию вакцины построили диаграмму, отображающую зависимость потери инфекционной активности вакцины от времени экспозиции. Полученные результаты в графическом виде представлены на рис. 2.

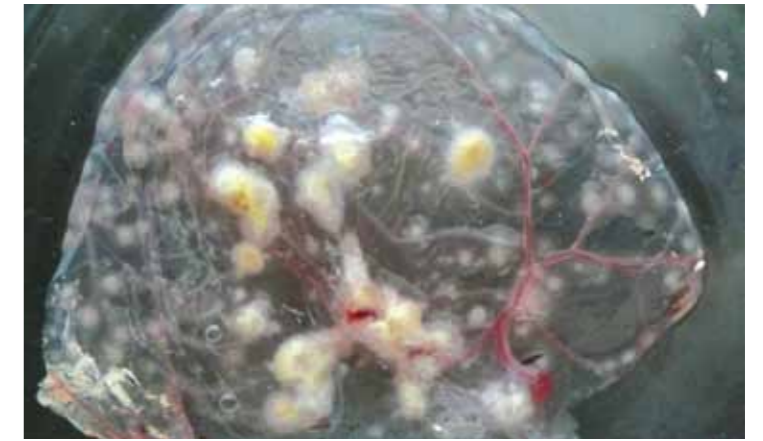
Приведенные на диаграмме (рис. 2) результаты иллюстрируют, что через 6 часов экспозиции значение инфекционного титра снижается на 0,21±0,16 lgЭИД50. Учитывая статистические характеристики измерений и ориентируясь на более осторожный прогноз сохранения инфекционной активности вируса, допустимое время использования разведенной эмбрион-вакцины приняли равным 4 часам.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были регламентированы характеристики эмбрион-вакцины против оспы птиц из штамма «КЭМ-7» с разбавителем, которые легли в основу нормативно-технологической документации на новый биопрепарат. Выбран двухигольный инъектор с иглами №110 в качестве стандартного, для которого рассчитан объем смачивания игл и прививной объем. Определены условия проведения иммунизации (глубина погружения инъектора в вакцину не менее 2/3 длины игл, наличие дополнительного (остаточного) объема ресуспендированной вакцины во флаконе), гарантирующие постоянную прививаемую дозу вируса птицам. В зависимости от количества доз во флаконе установлены объем фасовки эмбрион-вакцины и разбавителя, минимальное значение биологической активности вакцины. Перечисленные параметры обеспечивают эффективное применение данного препарата для специфической профилактики оспы птиц.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вакцина против оспы кур из аттенуированного штамма вируса оспы индеек / Ф.Б. Ширинов, В.Н. Годжаев, С.Н. Керимова, И.В. Гаджиев // Ветеринария. – 1994. – № 12. – С. 21-25.
2. Кожно-фолликулярный метод вакцинации цыплят против болезни Ньюкасла и оспы / Ю.Х. Креймер, Ю.Ф. Борисович, А.В. Качахидзе, К.Г. Аспанидзе // Ветеринария. – 1975. – № 8. – С. 47-49.



3. Похвальный С.А., Кулаков В.Ю. Иммунобиологические свойства аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур // Ветеринария и кормление. – 2011. – № 6. – С. 43-45.

4. Яременко Л.И., Кузнецова Г.Д., Гуненков В.В. Формирование иммунитета против оспы у цыплят, алиментарно вакцинированных в суточном возрасте // Сб. науч. тр. ВГНКИ: Всерос. гос. НИИ контроля, стандартизации и сертификации вет. препаратов. – М, 1996. – Т. 59. – С. 31-34.

5. Mocket A.P.A., Deuter A., Southee D.J. Fowlpox vaccination: routes of inoculation and pathological effects // Avian Pathology. – 1990. – Vol. 19. – P. 613-625.

6. Vaccination of 1-day-old chicks with fowlpox virus by the aerosol, drinking water, or cutaneous routes / E. Nagy [et al.] // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, № 3. – P. 677-682.

#### Технологические характеристики эмбрион-вакцины в зависимости от количества прививных доз во флаконе

Заданное количество прививных доз во флаконе	Объем фасовки		Инфекционный титр вируса в лиофилизированном препарате не менее, lgЭИД50/см <sup>3</sup>
	эмбрион-вакцины, см <sup>3</sup>	разбавителя, см <sup>3</sup>	
600	3	6	5,7
500	2	5	5,8
400	1	4	6,0

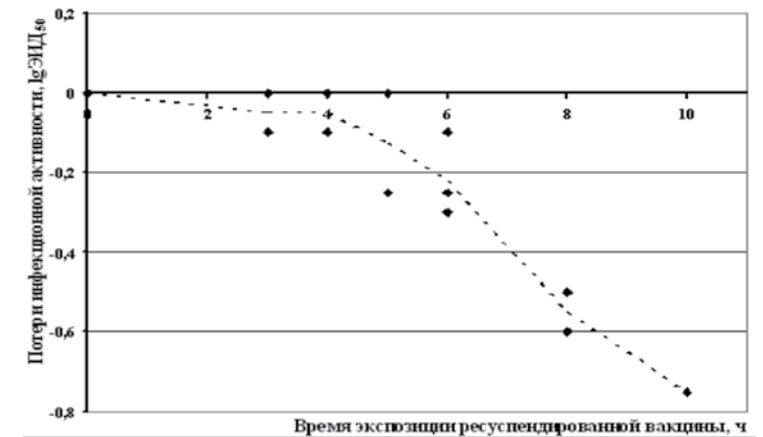


Рис. 2. Динамика потери инфекционной активности разведенной эмбрион-вакцины в разбавителе от времени ее экспозиции при температуре (37,0±0,5)°C



# REGULATION OF TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FOWLPOX “KEM-7” STRAIN-BASED EMBRYO VACCINE WITH DILUENT

S.A. Pokhvalny<sup>1</sup>, V.Yu. Kulakov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Leading Veterinarian, FGBI “ARRIAH”, Vladimir

<sup>2</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary medicine), FGBI “ARRIAH”, Vladimir

## SUMMARY

The following basic technological characteristics of the fowlpox embryo vaccine based on strain “KEM-7” with diluent were experimentally confirmed: filling volume of the embryo vaccine and diluent, minimum infectious titer of the vaccine depending on the number of doses per bottle. Permissible time of the biological activity retention of the given vaccine reconstituted in the diluent was determined.

**KEY WORDS:** fowl pox embryo vaccine with diluent, two-needle injector, volume of wetting of needles, inoculation volume of the vaccine.



## INTRODUCTION

Intradermal injection of the viral material exerts the highest immunizing effect in specific prophylaxis of fowl pox as compared to the intraocular, oral and aerosol routes of administration [4, 5, 6]. Dermal application of the viral material on denuded feather skin follicles on the inner surface of a thigh induces a strong immunity but this route of administration is time- and labour-consuming [1, 2].

A two-needle injector is usually used for intradermal inoculation. In this case needles of an injector are dipped in the resuspended vaccine and the vaccine is injected in a de-feathered area of a wing web. Thus, the intradermal administration of the viral material present on the surface of the needles is performed.

At the moment of puncturing the skin a certain amount of the vaccine is lost therefore the volume of wetting of the needles differ from the inoculation volume. Besides, a needle size and a depth of their immersion into the liquid vaccine are of significant importance. The abovementioned parameters govern the required level of biological activity of the vaccine and its amount used for immunization.

The study is aimed at experimental assessment and justification of the following technological characteristics of the given embryo vaccine: volume of wetting of the injector needles, inoculation volume of the vaccine, filling volume of the vaccine and diluent, number of inoculation doses per bottle, initial infectious activity of the vaccine and permissible time of the suspension conservation in the diluent.

## MATERIALS AND METHODS

Vaccine. “KEM-7” strain-based embryo vaccine against fowlpox which is a lyophilized homogenate of the virus containing tissue of chorioallantoic membranes of SPF chicken embryos supplemented with a stabilizer (experimental batch No. 3). Inoculation dose is 1000 EID50 [3].

Vaccine diluent. Isotonic Dulbecco's phosphate buffered saline with glycerol (pH 6.8-7.4).

Two-needle injector. Standard injector for intradermal inoculation: two 30 mm (h) sewing needles No. 110 (0046-02) fixed in a parallel way in a holder at a distance of 4 mm between them.

Experimental bird. Clinically healthy 25-45-day old chicks of Highsex-White cross non-immune to fowlpox.

Chicken embryos. SPF chicken embryos of 10-day incubation were used in the experiment. The embryos were incubated at (37.0±0.5)°C and 75-80% relative humidity. The embryos were inoculated into an artificial air chamber on the chorioallantoic membrane (CAM).

Determination of infectious virus titer in embryos and chicks. Titration was conducted using sequential ten-fold dilutions of the viral material. Each dilution (dose) was

tested in 6 test objects, and the percent of positives among them was determined. Virus specific proliferative and necrotized masses on the chorioallantoic membrane were considered a positive reaction. The virus titer was calculated using Kerber method.

Statistical processing of results. Common methods of determination of variances, standard errors and significance of differences of variable means were used. Microsoft Excel soft was used for calculations.

## RESULTS AND DISCUSSION

Calculation of volume of wetting of injector needles. Volume of wetting of injector needles was calculated based on the residual volume of the resuspended vaccine in a bottle after a set number of injections. For this purpose the weight of an empty bottle, weight of a bottle containing 5 cm<sup>3</sup> of the resuspended vaccine (m<sub>1</sub>) and weight of 1 μl of the resuspended vaccine (m<sub>2</sub>) were measured.

Then injections (n-number of times) were simulated by dipping the injector needles (2/3h) in a bottle with the resuspended vaccine and puncturing a construction consisting of 3 layers of filter paper. Subsequently, weight of the bottle with the vaccine after simulating injections (m<sub>3</sub>) was measured and volume of wetting of the injector needles (V<sub>w</sub>) was calculated according to the formula:

$$V_w = (m_1 - m_3) / (m_2 \times n)$$

V<sub>w</sub> was measured several times (see Table 1).

Calculation of inoculation volume of the vaccine. Inoculation volume (V<sub>in</sub>) was determined based on the ratio between the infectious titer of the vaccine (T<sub>i</sub>) determined using intradermal injection of the predetermined volume of the preparation in a wing web of a chick (V<sub>j</sub>) using an insulin syringe and the titer (T<sub>in</sub>) determined using the intradermal injection of the same preparation with a two-needle injector. Local inflammation signs characteristic of pox were considered a positive response of chicks to the inoculation. Chicks were observed during 14 days.

Inoculation volume (V<sub>in</sub>) was calculated according to the following formula:

$$\lg V_{in} = \lg T_{in} + \lg V_j - \lg T_j$$

V<sub>in</sub> was measured several times (see Table 1).

The results presented in Table 1 demonstrate that the intradermally inoculated volume of the vaccine (V<sub>in</sub> = 3.79±0.14) significantly (p≤0.001) differed from the volume of wetting of needles (V<sub>w</sub> = 6.38±0.23).

In practical terms it means that the volume of the preparation present on the surface of the needles after dipping the injector into the contents of a bottle exceeds the inoculation volume. The amount of the vaccine used is determined by the volume of wetting of needles and



minimum level of infectious activity of the vaccine i.e. by the inoculation volume.

Taking into account the results of the measurements made and being guided by more reliable technological characteristics it was considered expedient to assume the upper limit of the confidence interval (p≤0.05) of the mean value which was about 7 μl as the expected estimate of the volume of wetting. The approximate mean value of 4 μl should be assumed as the expected estimate of the volume of an intradermal inoculation.

Determination of infectious activity of the virus, filling volume of the embryo vaccine and diluent depending on the number of inoculation doses per bottle. In order to get the required inoculation immunizing dose the depth of immersion of the injector needles in the vaccine should be 2/3h. For this purpose the bottle position should be changed with the decrease of the vaccine volume (Fig. 1).

## Results of calculation of the volume of wetting of the injector needles and inoculation volume of the vaccine

No. of test	Volume of wetting of needles, μl	Inoculation volume of the vaccine, μl
1	5,872	3,54
2	7,059	4,32
3	5,589	3,42
4	6,695	3,75
5	6,723	4,08
6	6,368	3,63
Mean (x±m)	6,38±0,23	3,79±0,14

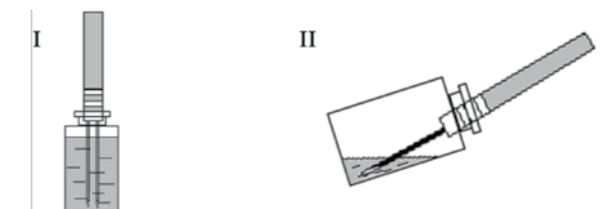


Fig. 1. Position of an injector and a bottle at the initial (I) and (final) stage of the vaccine use





To make the degree of wetting the needles constant (including when the total volume of the vaccine decreases and in case of an angular position of the bottle), an additional 1.5 cm<sup>3</sup> of the preparation should be added to each bottle. This volume of the resuspended vaccine is not used and subject to sterilization.

Based on the calculated values the main technological characteristics of the proposed fowlpox "KEM-7" strain-based embryo vaccine were determined. Alternatives of filling volume of the vaccine, as well as the infectious virus titer in the lyophilized material are presented in Table 2.

#### Technological parameters of the embryo vaccine depending on the number of inoculation doses per bottle

Set number of inoculation doses per bottle	Filling volume		Infectious virus titer of the lyophilized preparation at least, lg EID <sub>50</sub> /cm <sup>3</sup>
	Embryo vaccine, cm <sup>3</sup>	Diluent, cm <sup>3</sup>	
600	3	6	5,7
500	2	5	5,8
400	1	4	6,0

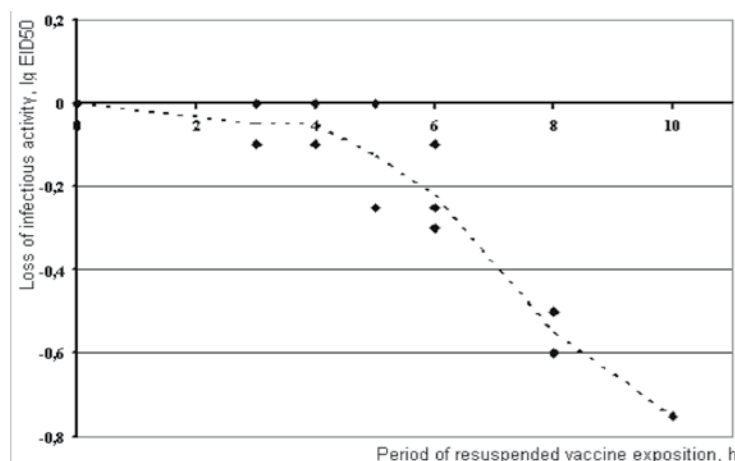


Fig. 2. Dynamics of infectious activity loss of the embryo vaccine resuspended in the diluent depending on the time of its exposition at (37.0±0.5)±C

Determination of the permissible time of biological activity retention of the vaccine resuspended in the diluent. Titration in SPF chicken embryos was performed immediately after the dilution and at 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 hours post exposition. The diluted vaccine was exposed at a thermostat at (37.0±0.5)°C, and the position of a bottle with the vaccine in the hand of a vaccinator was simulated at that.

Based on the titration data a diagram was plotted depicting the relationship of the vaccine infectious activity loss with the exposition time. The results obtained are presented in Fig. 2.

The results presented in the diagram (Fig. 2) demonstrate that the infectious titer of the vaccine exposed during 6 hours decreases by 0.21±0.16 lg EID<sub>50</sub>. Taking into account statistical characteristics of the measurements and assuming a more guarded prognosis of the virus infectious activity retention the permissible time of use of the diluted embryo vaccine should be 4 hours.

#### CONCLUSION

Results of the conducted tests enabled determining characteristics of the fowlpox "KEM-7" strain-based embryo vaccine with diluent which formed the basis of the standard technical documents for the new biological. A two-needle injector with No. 110 needles was selected as a standard for which the volume of wetting of needles and inoculation volume were calculated. The conditions of immunization procedure (the depth of an injector immersion in the vaccine should be at least 2/3 length of a needle, additional (residual) volume of the resuspended vaccine in a bottle) were established ensuring a constant dose for chick inoculation. Depending on the number of doses per bottle the filling volumes of the vaccine and diluent, minimum value of biological activity of the vaccine were set. The listed parameters ensure the efficient use of the given preparation for specific prevention of fowlpox.

#### REFERENCES

1. Fowlpox vaccine based on attenuated turkey pos virus strain // F.B. Shirinov, V.N. Godzhayev, S.N. Kerimova, I.V. Gadzhiyev // Veterinariya. – 1994. – No. 12. – P. 21-25.
2. Vaccination of chicks into skin follicles against Newcastle disease and fowlpox / Yu.Kh. Cramer, Yu.F. Borisovich, A.V. Kachakhidze, K.G. Aspanidze // Veterinariya. – 1975. – No. 8. – P. 47-49.
3. Pokhvalny S.A., Kulakov V.Yu. Immunobiological characteristics of attenuated fowlpox virus strain "KEM-7" // Veterinariya i Kormleniye. – 2011. – No. 6. – P. 43-45.
4. Yaremenko L.I., Kuznetsova G.D., Gunenkov V.V. Establishment of immunity against fowlpox in chicks vaccinated with feed or drinking water at one day old age // Proceedings of VGNI: All-Russian State Research Institute of Control, Standardization and Certification of Veterinary Preparations. – M, 1996. – V. 59. – P. 31-34.
5. Mocket A.P.A., Deuter A., Southee D.J. Fowlpox vaccination: routes of inoculation and pathological effects // Avian Pathology. – 1990. – Vol. 19. – P. 613-625.
6. Vaccination of 1-day-old chicks with fowlpox virus by the aerosol, drinking water, or cutaneous routes / E. Nagy [et al.] // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, № 3. – P. 677-682.

# СОВРЕМЕННАЯ ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО КЧС В РОССИИ

A.A. Shevtsov, V.L. Gavrilova, O.Y. Goryshev, K.N. Gruzdev

Federal Governmental Institution «Federal Centre for Animal Health» (FGI «ARRIAH»), Vladimir, Russia

А.А. Шевцов, В.Л. Гаврилова, О.Ю. Горюшев, К.Н. Груздев

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

#### SUMMARY

Outbreaks of classical swine fever are reported annually in different parts of Russia, both in domestic swine and in wild boars. From 1991 to 1996 an average number of affected sites per year was 43, from 1997 to 2005 the number reduced to 10 and from 2006 to 2009 it reduced to 4. However, 14 and 15 CSF-affected sites were registered in 2010 and 2011. Biological properties of CSF epizootic virus isolates recovered from wild boars in different parts of Russia in 2010 - 2011 were studied with the help of bioassay in susceptible animals and using serological tests. The recovered CSF virus isolates turned out to be virulent for swine and vaccines used in Russia demonstrate sufficient antigenic activity against the tested epizootic CSF virus isolates.

#### РЕЗЮМЕ

Вспышки классической чумы свиней как у домашних, так и у диких свиней на территории отдельных регионов России регистрируются ежегодно. В период с 1991 по 1996 гг. среднегодовое количество неблагополучных пунктов было 43, с 1997 по 2005 гг. их число снизилось до 10, а с 2006 по 2009 гг. - до 4. Однако в 2010 г. было зарегистрировано 14, а в 2011 г. - 15 неблагополучных по КЧС пунктов. Биологические свойства эпизоотических изолятов вируса КЧС, выделенных в 2010-2011 гг. от свиней из ряда регионов России, изучали с помощью проведения биопробы на восприимчивых животных и с использованием серологических реакций. Установлено, что выделенные изоляты вируса КЧС были вирулентными для свиней, а применяющиеся в России вакцины обладают достаточной иммуногенной активностью к испытуемым эпизоотическим изолятам вируса КЧС.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе по изучению биологических свойств использовали изоляты вируса КЧС:

- «907» – 3 пассаж в РК-15, выделен в 2010 г. из патматериала от дико-го кабана из Волгоградской обл., получен из ГНУ «ВНИИВВиМ» Россельхозакадемии;
- «Камешковский», выделен в 2011 г. из патматериала от свиньи из Владимирской области.

Подопытные животные: 7 серонегативных к вирусу КЧС свиней из благополучного по данному и другим инфекционным заболеваниям хозяйства.

НРИФ и РНФМБ проводили по общепринятой схеме.

#### СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последние годы эпизоотическая ситуация по КЧС остается относительно стабильной и ограничивается вспышками заболевания в отдельных регионах страны. Данные о неблагополучии по КЧС за последние 6 лет представлены в таблице.

Приведенные сведения указывают на то, что на территории Московской, Волгоградской области, Краснодарского края вспышки КЧС регистрировались в течение нескольких лет.

Все выявленные случаи заболевания домашних свиней были в фермах с поголовьем не более 200 свиней, где животных не прививали против КЧС или их иммунизация проводилась с нарушениями. В ряде случаев были установлены хозяйственные связи между неблагополучными по КЧС хозяйствами.

За анализируемый период времени 2006-2011 гг. КЧС регистрировали среди диких кабанов в Московской, Тверской, Волгоградской, Воронежской, Саратовской, Владимирской, Смоленской областях. По май 2012 г. зафиксирован 1 неблагополучный пункт по классической чуме домашних свиней в Волгоградской области (в стаде из 5 голов заболело и пало одно животное), а также в Брянской, Смоленской и Саратовской областях 3 вспышки среди диких кабанов. Здесь из общей численности трех стад в 62 головы заболело 11 и пало 7 диких кабанов. Наблюдения за проявлением КЧС у диких свиней в ряде неблагополучных регионов страны указывают на еще меньшее число гибели животных от КЧС (менее 1% от популяции).

С целью определения вирулентных свойств эпизоотических изолятов вируса КЧС, выделенных в 2010-2011 гг. от свиней из Волгоградской и Владимирской областей, заразили внутримышечно 7 серонегативных к вирусу КЧС подсвинок (доза заражения 2,0 см<sup>3</sup> × 3,25 lg ККИД<sub>50</sub>/0,150 см<sup>3</sup>). Гипертермия у свиней развилась на вторые-третьи сутки после заражения, на 4-5 сутки температура тела животных достигла 41,0-42,0°С и эти значения сохранялись до 12-15 дня после инфицирования. У свиней наблюдали угнетение, отсутствие аппетита, чередование запоров и диареи, затрудненное дыхание, кашель, хрипы, истечение из носовой полости, точечные





кровоизлияния на коже внутренних поверхностей конечностей, ушных раковин. На 15 - 22 сутки животные были умерщвлены для подтверждения диагноза на КЧС. При аутопсии были обнаружены типичные для КЧС патологические изменения внутренних органов, в том числе: точечные кровоизлияния на надгортан-

нике, в подкожной клетчатке, под капсулой почек, геморрагии в мочевом пузыре, регионарных лимфатических узлах, крупозно-дифтеритический колит с гиперплазией солитарных фолликулов. Отобранные пробы от зараженных животных исследовали на наличие вируса КЧС при помощи непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ). Вирус КЧС удалось обнаружить во всех исследованных органах и тканях, полученных от зараженных животных, наибольшая его концентрация установлена в миндалинах, лимфатических узлах и селезенке. В более низкой концентрации вирус был обнаружен в почках и легких, в минимальном количестве – в крови, печени и сердце.

Для изучения серологических свойств эпизоотических изолятов вируса КЧС из Владимирской и Волгоградской областей их использовали в качестве антигена для постановки реакции нейтрализации флюоресцирующих микробляшек (РНФМБ). Указанным методом проводили исследование сывороток крови, отобранных от привитых разными вакцинами свиней. Титры вируснейтрализующих антител в испытуемых сыворотках крови свиней были в пределах от  $4,56 \pm 0,44$  до  $5,75 \pm 0,25 \log_2$ , что указывает на достаточную иммуногенную активность применяющихся в РФ вакцин к испытанным вирулентным эпизоотическим изолятам вируса КЧС.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что выделенные от свиней из Владимирской и Волгоградской областей изоляты вируса КЧС были вирулентными для подсвинков, вызывали у них развитие заболевания с признаками, характерными для острой формы КЧС. Также показано, что применяющиеся в России вакцины способны вызывать у свиней продукцию вируснейтрализующих антител к испытанным эпизоотическим изолятам вируса КЧС.

Число неблагополучных по КЧС пунктов в России за 2006-2010 гг.

	Субъект РФ	2006	2007	2008	2009	2010	2011
1	Владимирская область	0	0	0	0	0	4,3 (дк*)
2	Воронежская область	0	0	0	0	2,4 (дк*)	0
3	Волгоградская область	0	1	1	3 (дк*)	4 (дк*)	0
4	Московская область	0	1 (дк*)	1	0	0	0
5	Ивановская область	0	0	0	0	1	0
6	Калужская область	1	0	0	0	0	0
7	Костромская область	0	0	0	0	1	0
8	Краснодарский край	0	1	0	1	0	6
9	Нижегородская область	0	0	1	0	0	0
10	Приморский край	0	1	0	0	0	0
11	Ставропольский край	0	2	0	0	0	0
12	Саратовская область	0	0	0	0	1, 1 (дк*)	0
13	Смоленская область	0	0	0	0	0	1,1 (дк*)
14	Тверская область	1 (дк*)	0	0	0	0	0
	<b>Итого</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>15</b>

\*дк – КЧС среди диких кабанов

# CURRENT CSF EPIDEMIC SITUATION IN RUSSIA

A.A. Shevtsov<sup>1</sup>, V.L. Gavrilova<sup>2</sup>, O.Yu. Goryushev<sup>3</sup>, K.N. Gruzdev<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), the FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>2</sup>Researcher, Candidate of Science (Biology), the FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>3</sup>Leading Veterinarian, Postgraduate, the FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>4</sup>Chief Expert in Porcine Diseases, Doctor of Science (Biology), Professor, the FGBI "ARRIAH", Vladimir

#### SUMMARY

Outbreaks of classical swine fever are reported annually in different parts of Russia, both in domestic swine and in wild boars. From 1991 to 1996 an average number of affected sites per year was 43, from 1997 to 2005 the number reduced to 10 and from 2006 to 2009 it reduced to 4. However, 14 CSF-affected areas were registered in 2010, and 15 – in 2011. Biological properties of CSFV epidemic isolates recovered from wild boars in different parts of Russia in 2010 - 2011 were studied using bioassay in susceptible animals and serological tests. The recovered CSF virus isolates turned out to be virulent for piglets and vaccines used in Russia demonstrate sufficient immunogenic activity against the tested epidemic CSFV isolates.

#### MATERIALS AND METHODS

CSFV isolates were used for examination of biological properties: – "907" – 3rd passage in PK-15, isolated from pathological material from a wild boar from the Volgograd Oblast in 2010 was obtained from the SRI "NRIVVaMR" of the RAAS (State Research Institution "National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia" of the Russian Academy of Agricultural Science); – "Kameshkovsky" – isolated from pathological material from a pig from the Vladimir Oblast in 2011.

Experimental animals: 7 pigs seronegative to CSFV from a farm considered free from CSF and other infectious diseases.

IIFT and FMPNT were carried out according to standard scheme.

#### PERSONAL INVESTIGATIONS

CSF epidemic situation remains rather stable and is limited to outbreaks in several regions of the country. Data on CSF-affected areas for the last 6 years are presented in the table.

Information presented demonstrates that CSF outbreaks were registered in the Moscow Oblast, the Volgograd Oblast and the Krasnodar Krai during several years.

All the disease cases in domestic pigs were detected on small farms with the population of not more than 200 pigs, where animals had not been vaccinated against CSF or their immunization had been carried improperly. In some cases links were detected between CSF-affected farms.

Classical swine fever was detected in wild boars in the Moscow, Tver, Volgograd, Voronezh, Saratov, Vladimir and Smolensk Oblasts during the analyzed period from 2006 to 2011. In February, 2012 a CSF outbreak was reported in the Bryansk Oblast where 5 wild boars had been found dead. Observations of CSF signs in wild pigs in some of the above mentioned regions





denote a low number of dead animals (less than 1 % of population).

In order to determine virulent properties of the epidemic CSFV isolates recovered from pigs from the Volgograd and Vladimir Oblasts, 7 CSFV seronegative piglets of 20-25 kg weight were inoculated intramuscularly (2.0 cm<sup>3</sup> x 3.25 lg CCID<sub>50</sub>/150 cm<sup>3</sup> infective dose). Hyperthermia in piglets developed on day 2-3 post inoculation, on day 4-5 the body temperature was 41.0-42.0°C, persisting till day 12-15 post inoculation. Depression, anorexia, alternation of constipation and diarrhea, gasp, cough, rale, nasal discharge, petechial hemorrhages on the inner surface of legs and ears were observed in animals. Animals were euthanized on day 15-22 for CSFV diagnosis confirmation. Pathological lesions of visceral organs typical for CSF were detected during

the post-mortem examination, including: petechial hemorrhages on the epiglottis, in the adipose layer, under the renal capsule, hemorrhages in the bladder, regional lymph nodes, croupous-diphtheric colitis with the hyperplasia of solitary follicles. Samples taken from infected animals were investigated for CSFV virus using indirect immunofluorescence test (IIFT). CSFV was detected in all the tested organs and tissues obtained from the affected animals. The highest concentration was observed in tonsils, lymphatic nodes and spleen. Lower concentrations of the virus were detected in kidneys and lungs, the minimum level was found in blood, liver and heart.

CSFV epidemic isolates from the Vladimir and Volgograd Oblasts were used as an antigen for fluorescent micro plaque neutralization test (FMPNT) in order to study their serological properties. Blood sera taken from pigs inoculated with different vaccines were investigated using the method mentioned. Virus-neutralizing antibody titres in tested porcine sera ranged within 4.56±0.44 and 5.75±0.25 log<sub>2</sub> indicating sufficient immunogenic activity of the vaccines used in the Russian Federation against the tested virulent CSF epidemic isolates.

### CONCLUSION

Increase in number of registered CSF-affected sites was observed during the last two years as compared with the previous four years.

It was established that the recovered CSFV isolates from the Vladimir Oblast and the Volgograd Oblast were virulent for piglets and caused disease with the signs characteristic for an acute form of CSF. It was also demonstrated that vaccines used in Russia could initiate virus-neutralizing antibody production in pigs against the tested epidemic CSFV isolates.

Number of CSF-affected sites in Russia in 2006-2010

	RF Subject	2006	2007	2008	2009	2010	2011
1	Vladimir Oblast	0	0	0	0	0	4,3 (wb*)
2	Voronezh Oblast	0	0	0	0	2,4 (wb*)	0
3	Volgograd Oblast	0	1	1	3 (wb*)	4 (wb*)	0
4	Moscow Oblast	0	1 (wb*)	1	0	0	0
5	Ivanovo Oblast	0	0	0	0	1	0
6	Kaluga Oblast	1	0	0	0	0	0
7	Kostroma Oblast	0	0	0	0	1	0
8	Krasnodar Krai	0	1	0	1	0	6
9	Nizhny Novgorod Oblast	0	0	1	0	0	0
10	Primorsky Krai	0	1	0	0	0	0
11	Stavropol Krai	0	2	0	0	0	0
12	Saratov Oblast	0	0	0	0	1, 1(wb*)	0
13	Smolensk Oblast	0	0	0	0		1,1 (wb*)
14	Tver Oblast	1 (wb*)	0	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>15</b>

\*wb– CSF in wild boars

## ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

### Журнал «Ветеринария сегодня» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция «Ветеринарии сегодня» рада предложить Вам возможность для публикации Ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – рассмотрение основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.

Мы ждем на страницах журнала статьи, как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и для новых научных дискуссий.

Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» («ВНИИЗЖ»). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Тематическое содержание журнала меняется в зависимости от текущих задач науки и практики, распространяется по всей территории России, а также в крупнейшие мировые научные центры.

#### ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных, представление результатов теоретических и экспериментальных исследований в данной области.



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

#### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12-ти страниц – но не менее 5-ти (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы). В случае если, у вас нет возможности перевести статью самостоятельно, редакция в индивидуальном порядке готова помочь решить эту проблему.

#### СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ\*

1. Название статьи;
2. Имя, отчество, фамилия автора;
3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты;
4. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающие фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300-500 знаков с пробелами);
5. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи;
6. Введение;
7. Материалы и методы;
8. Результаты и обсуждения;
9. Выводы и заключение;
10. Список литературы (т.е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи) : Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008;
11. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (Рисунки не соответствующие требованиям будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно);
12. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии учреждения.

\*В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – полуторный, размер полей по 2 см, отступ в начале абзаца 1 см, форматирование по ширине.

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

#### БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ О ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec

телефон: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88

Контактное лицо: Борисова Ольга Анатольевна (тел. добавочный 22-27)

Иголкин Алексей Сергеевич (тел. добавочный 20-20)

Ветеринария сегодня – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



# ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»



(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Ведущий центр разработчиков и производителей ветеринарных препаратов для профилактики и диагностики болезней птиц, свиней и рогатого скота (производится около 100 наименований вакцин и около 50 наименований диагностических наборов).

- Референтная лаборатория по бешенству в РФ
- Референтная лаборатория по гриппу и ньюкаслской болезни птиц в РФ
- Испытательный центр



Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»

- Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья
- Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру

Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,  
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  
Тел./факс: (4922) 26-38-77, 26-15-25. Тел.: (4922) 26-06-14, 26-15-12  
e-mail: arriah.ru; <http://www.arriah.ru>