

ISSN 2304-196X

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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

ФЕВРАЛЬ №1 {12} 2015



ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

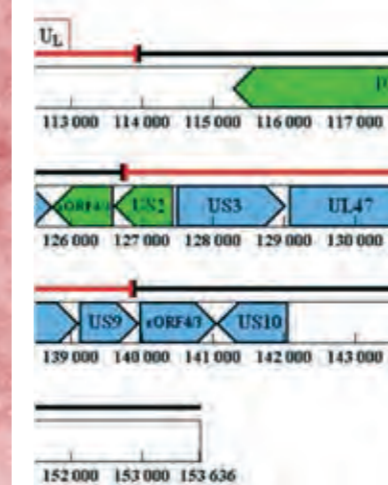


Ведущий центр разработчиков и производителей ветеринарных препаратов для профилактики и диагностики болезней птиц, свиней и рогатого скота (производится более 100 наименований вакцин и около 50 наименований диагностических наборов).

- 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
- Референтный центр FAO по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

Деятельность осуществляется в соответствии с межгосударственными стандартами (идентичные международным) ГОСТ ISO 9001-2011 (ISO 9001:2008), ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 (ISO/IEC 17025:2005) и национальным стандартом (идентичным правилам GMP Европейского Союза) ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»

600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец
Тел./факс: (4922) 26-38-77, 26-15-25, 26-15-51, 38-30-30, 26-18-56
Тел.: (4922) 26-06-14, 26-17-65
E-mail: mail@arriah.ru http://www.arriah.ru



Ветеринария сегодня №1 (12) 2015 научный журнал

Главный редактор: Лозовой Дмитрий Анатольевич – кандидат ветеринарных наук, временно исполняющий обязанности директора ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, тел./факс. 8-4922-26-15-73, e-mail: losovoy@arriah.ru

Шеф-редактор: Анна Глаголева

Выпускающие редакторы: Ольга Борисова, Юлия Трофимова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова
e-mail: veterinarytoday@yandex.ru, тел.: +7915 477 78 36

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

– **О.А. Борисова** – кандидат ветеринарных наук, ведущий 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»;

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

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

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

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

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

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

– **Г.С. Исаева** – д.ф.н., к.с.-х.н., вице-министр Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан;

– **Ю.А. Пивоварчик** – первый заместитель директора Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия – Главный государственный ветеринарный инспектор Республики Беларусь;

– **П.А. Красочко** – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук профессор, академик РАЕН, директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»;

– **А.Р. Сансызбай** – доктор ветеринарных наук, профессор, генеральный директор Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Дизайн и верстка: Мария Поваляева

Корректор: Лариса Грибникова

Менеджер по подписке и дистрибуции: Игорь Алпатов +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.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему – Российский индекс научного цитирования (РИНЦ). Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU.

Тираж 2000 экземпляров. Цена свободная.

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

Издатель: ООО «Успех»
105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д.13, оф. 402

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

Типография: ООО «Юнион Принт», 603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: (831) 439-44-99
Подписано в печать 11 февраля 2015 года

СОДЕРЖАНИЕ

- 5** В.В. Макаров, О.И. Сухарев
Эболавирусная болезнь: общая характеристика, природная очаговость, ветеринарные аспекты
- 9** А.М. Тимина, М.Р. Якупов, А.В. Щербаков
Результаты участия в международных сличительных испытаниях по диагностике африканской чумы свиней
- 15** В.М. Захаров, А.В. Кононов, В.А. Мищенко
0 случаев выявления вакциноподобного вируса блютанга 14-го серотипа в РФ и в странах Европы в 2011–2012 гг.
- 25** С.А. Похвальный, В.Ю. Кулаков, А.С. Самсонова
Применение теста «замедленной реакции сережек» у кур для экспресс-оценки напряженности иммунитета к оспе птиц
- 29** Д.С. Большаков, В.Г. Амелин, Т.Б. Никешина
Возможности метода капиллярного электрофореза при анализе готовых лекарственных средств антибактериального действия
- 36** Н.Г. Зиняков, Е.В. Овчинникова, С.П. Лазарева, А.А. Козлов, И.А. Чвала
Внедрение технологии 454 Life Sciences в лабораторную практику
- 44** М.В. Бирюченкова, А.М. Тимина
Разработка тест-системы для обнаружения *Eperythrozoon suis* на основе полимеразной цепной реакции
- 50** А.А. Козлов, Н.С. Мудрак, И.А. Чвала
Случай выявления вируса инфекционного ларинготрахеита у павлина
- 53** С.И. Джупина
Различия контроля над эпизоотическими процессами пастереллёза и геморрагической септицемии

CONTENTS

- 5** V.V. Makarov, O.I. Sukharev
Ebola virus disease: general characteristics, natural nidality, veterinary aspects
- 9** A.M. Timina, M.R. Yakupov, A.V. Scherbakov
Results of participation in international proficiency testing on African swine fever diagnostics
- 20** V.M. Zakharov, A.V. Kononov, V.A. Mischenko
Cases of detection of serotype 14 bluetongue vaccine-like virus in the RF and European countries in 2011–2012
- 25** S.A. Pokhvalny, V.Yu. Kulakov, A.S. Samsonova
Application of «delayed wattle reaction» assay in chicken for rapid assessment of anti fowl pox immunity level
- 29** D.S. Bolshakov, V.G. Amelin, T.B. Nikeshina
Capabilities of capillary electrophoresis for analysis of ready-to-use pharmaceutical products with an antibacterial effect
- 40** N.G. Zinyakov, Ye.V. Ovchinnikova, S.P. Lazareva, A.A. Kozlov, I.A. Chvala
Implementation of 454 Life Sciences technology laboratory practices
- 47** M.V. Biryuchenkova, A.M. Timina
Development of polymerase chain reaction based test system for *Eperythrozoon suis* detection
- 50** A.A. Kozlov, N.S. Mudrak, I.A. Chvala
Detection of infectious laryngotracheitis virus in a peacock
- 53** S.I. Dzhupina
Different types of control over epidemic processes of pasteurellosis and haemorrhagic septicemia

ЭБОЛАВИРУСНАЯ БОЛЕЗНЬ:

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ПРИРОДНАЯ ОЧАГОВОСТЬ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ АСПЕКТЫ

В.В. Макаров¹, О.И. Сухарев²¹ доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва, e-mail: vvm-39@mail.ru² доктор ветеринарных наук, Российский университет дружбы народов, г. Москва

РЕЗЮМЕ

В статье обсуждается краткая история, общая характеристика, паразитарная система, эпидемический процесс Эболавирусной болезни.

Ключевые слова: эпидемии, зоонозы, вирусные геморрагические лихорадки, Эболавирусная болезнь.

EBOLA VIRUS DISEASE:

GENERAL CHARACTERISTICS, NATURAL NIDALITY, VETERINARY ASPECTS

V.V. Makarov¹, O.I. Sukharev²¹ Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, e-mail: vvm-39@mail.ru² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

SUMMARY

The paper presents brief history, general characteristics, parasitic system, and epidemic process of Ebola virus disease.

Key words: epidemic, zoonoses, viral hemorrhagic fever, Ebola virus disease.

Возникновение и распространение в регионе Западной Африки в течение 2014 г. болезни, вызываемой вирусом Эбола (ЭВБ, Ebola virus disease, EVD, ранее известной как «геморрагическая лихорадка Эбола»), — очередное проявление глобального феномена непрекращающейся эмерджентности опасных инфекций [3, 7, 8]. Активизация эпидемического процесса этого экзотического фатального зооноза происходит стереотипно вслед за аналогичным возникновением блютанга и блютангоподобных инфекций жвачных на неэндемич-

ных территориях северо-запада Европы, африканской чумы свиней в Евразийском регионе, пандемиями высокопатогенного птичьего (H5) и свиного (H1) гриппа. В основе явления — всевозможные трансформации сложных паразитарных эпистем природноочагового и териозоонозного типов, возникающие из-за причин природного, антропогенного, техногенного и т.п. порядка [3].

ЭВБ относится к специфической категории зоонозных вирусных геморрагических лихорадок, на-

считывающей существенное количество выделяемых по этому признаку заболеваний. Геморрагический синдром (кровоточивость) является обязательным компонентом патогенеза и типичным клиническим признаком для инфекций этой группы, таких как Марбургвирусная болезнь, ольская, крымская, аргентинская (Хуни) и боливийская (Мачупо) геморрагические лихорадки, лихорадка долины Рифт и Ласса, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и др. [1, 9].

Кроме того, геморрагический диатез сопровождает течение многих системных инфекций (африканская и классическая чума, репродуктивный и респираторный синдром свиней, грипп птиц и ньюкаслская болезнь, рожа, лептоспирозы, пастереллез-геморрагическая септицемия, некоторые арбовирусные инфекции).

ЭВБ как новая острая тяжелая фатальная инфекция впервые появилась в 1976 г. в Судане и Демократической Республике Конго. В последующем и до на-

стоящего времени практически ежегодно возникали эпидемические вспышки по всему континенту с формированием эндемии с количеством случаев от 1 до >600 в год, эндемическим уровнем в 65 случаев, с общим числом погибших до эпидемии 2014 г. >1500, летальностью от 41 до 100% [7, 8, 9] (рис. 1 и 2).

Возбудитель новой инфекции — представитель рода *Ebolavirus* (Эболавирус) семейства *Filoviridae* (рис. 3), включающего также не менее опасный патоген *Marburgvirus* (Марбургвирус). В их числе идентифицировано 6 видов (субтипов) филовирусов. Три Эболавируса: *Bundibugyo* (Бундибугио), *Zaire* (Заир), *Sudan* (Судан) — и Марбургвирус (единственный субтип) являются чрезвычайно инфекционными и ассоциированы с эпидемическими вспышками геморрагических лихорадок человека в странах Африки (рис. 2). Еще два Эболавируса: *Reston* (Рестон) и *Côte d'Ivoire* (Кот-д'Ивуар) — эпидемического значения не имеют. По результатам многолетней статистики вспышек ЭВБ африканские виды различаются по вирулентности: летальность, сопровождающая вызванные ими вспышки, составила 25–51% для Бундибугио, 53–65% для Заира и 60–100% для Судана. Эпидемия 2014 г. вызвана вирусом Заир [5, 6, 7].

Геморрагические лихорадки, вызываемые филовирусами, представляют важную проблему для здравоохранения стран Субсахарной Африки. С 1967 г. (первой регистрации болезни Марбург) до 2011 г. зарегистрировано 2870 случаев, в том числе 270 (9%) среди медицинского персонала (врачи, медицинские сестры, работники парамедицины). Если первые вспышки в Центральной Африке возникали преимущественно среди аборигенов глухих поселений тропических лесов, то в последующем, в Западной Африке, в эпидемический процесс было вовлечено и городское население [7, 8].

Рис. 1. Хронология вспышек ЭВБ в странах Африки, предшествующих эпидемии 2014 г. [7, 8, 9]

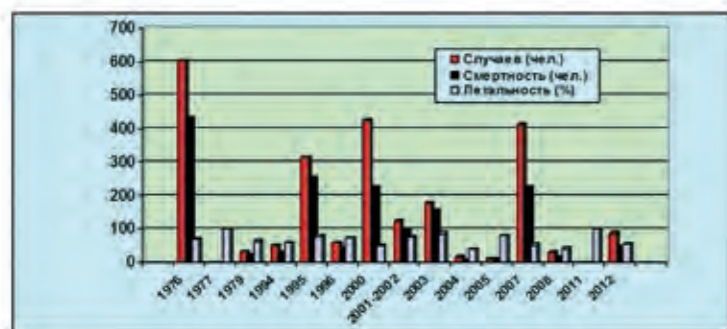
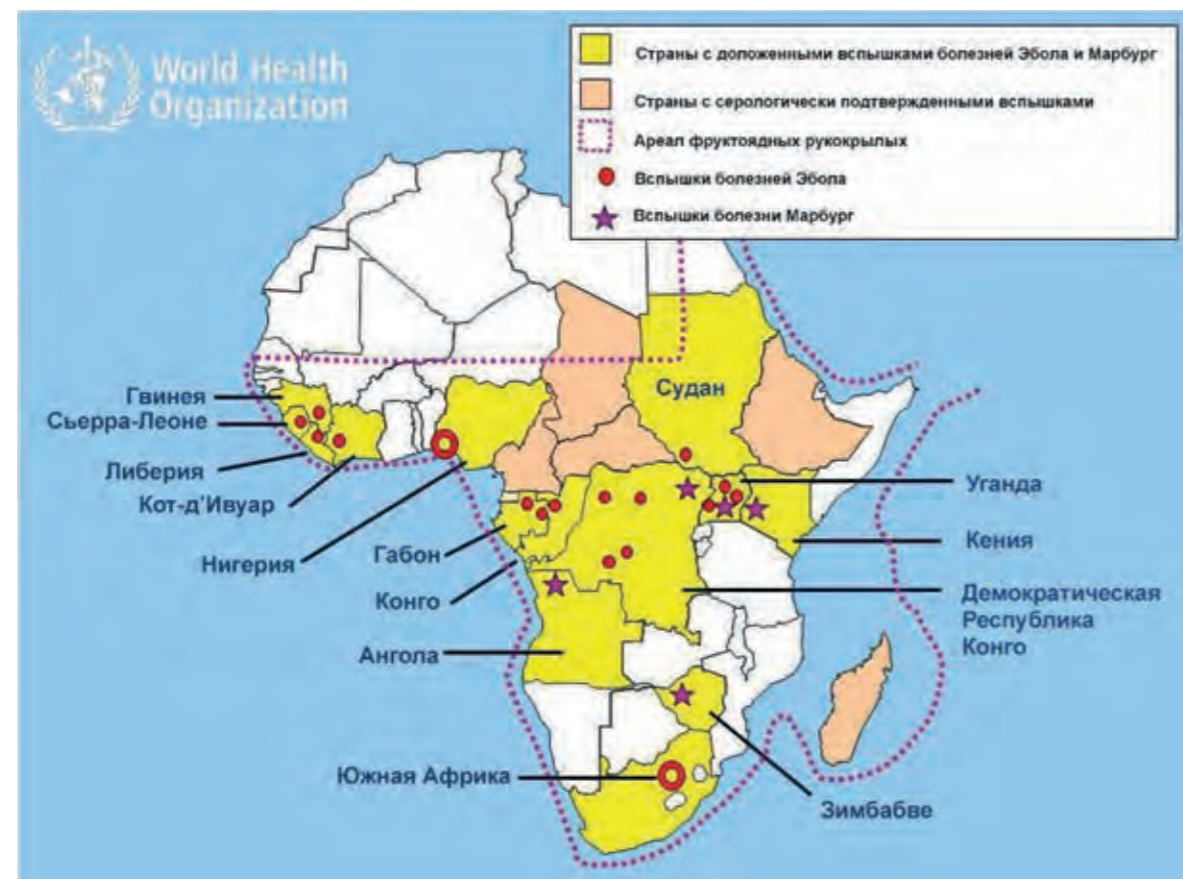


Рис. 2. Нозогеография ЭВБ и болезни Марбург [7]



В клиническом отношении ЭВБ представляет собой типичный острый тяжелый высоколетальный геморрагический синдром инфекционной этиологии. Инкубационный период составляет от 2 до 21 сут. Первый признак — внезапное повышение температуры, мышечная и головная боль, сухость в горле. За этим следуют тошнота, диарея, сыпь, симптомы почечной и печеночной недостаточности, в некоторых случаях как внутренние, так и наружные кровотечения (например, кровоточивость десен и кровь в стуле). Лабораторные показатели включают пониженное содержание лейкоцитов и тромбоцитов и повышение уровня печеночных ферментов. До развития симптомов инфицированный субъект не представляет опасности для окружающих. Лишь с появлением кровоточивости возможны случаи вторичного и третичного заражения, исключительно редкие по статистике, в основном среди персонала госпиталя, возникающие в силу несоблюдения элементарных мер защиты от прямого контакта. Человек, больной ЭВБ, — эпидемический тупик, как источник возбудителя в тривиальном понимании цепной передачи инфекции эпидемического значения не имеет [1, 8, 9].

Такое положение объясняется тем, что ЭВБ, так же как и Марбургвирусная болезнь, представляет собой типичную природноочаговую инфекцию. Ее сбалансированная паразитарная система может быть охарактеризована как простая, замкнутая, двучленная. Хозяином Эболавируса являются фруктоядные «летучие мыши» — рукокрылые, представители семейства *Pteropodidae*, в основном родов *Hypsiprygnis*, *Epotops* и *Myonycteris*. Нозогеографическое распространение ЭВБ полностью совпадает с ареалом последних на территории Африки [5, 6, 7] (рис. 2).

В эпидемиологическом контексте эта система представляет естественный резервуар инфекции, где в экологическом соответствии со смыслом резервации устанавливается паразитический, преимущественно бессимптомный баланс «Эболавирус+хозяин» с формированием бесконечной природноочаговой эндемии. Это состояние динамично и подвержено воздействию различных объективных факторов (климат, обилие корма, антропогенные вмешательства и т.п.) — внешних механизмов саморегуляции паразитарной системы. При возникновении дисбаланса в пользу хозяина и росте его популяции активируются уже внутренние, эндогенные регуляторы, прежде всего скрытые эпидемические процессы.

Согласно канонической сукцессии в функционировании природноочаговых паразитарных систем инфекция сначала смещается на амплификаторов — наиболее близких сообитателей тропических лесных биотопов (приматы, живущие на тех же деревьях и питающиеся теми же плодами, лесные антилопы, дикобразы, возможно, пасущиеся в лесах домашние свиньи). Животные-амплификаторы подвергаются прямому контактному заражению, у них ЭВБ протекает не самым тяжелым образом уже в форме эпидемических вспышек.

Вместе с амплификаторами инфекция «спускается» с крон тропических деревьев на землю. Это обуславливает следующий этап сукцессии — первичную инфекцию людей, имеющих с ними прямой контакт. Прежде всего это охотники и переработчики добытых шимпанзе, макак, горилл, крупных «летучих мышей», мясо которых употребляется аборигенами в пищу, и лица, пренебрегающие естественными запретами в общении с животными. ЭВБ возникает в форме спорадических ин-

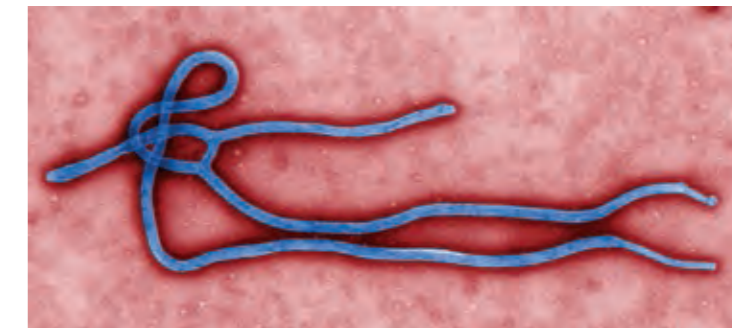


Рис. 3. Эболавирус (wikipedia.com)

декс-случаев острой фатальной инфекции. Еще более редкая, казуистическая вторичная заболеваемость возникает при тесном контакте с больными и умершими от ЭВБ уже главным образом среди медицинского персонала (см. выше) и близких, имеющих тесные и своеобразные ритуальные контакты в процессе ухода и похорон [7, 8, 9].

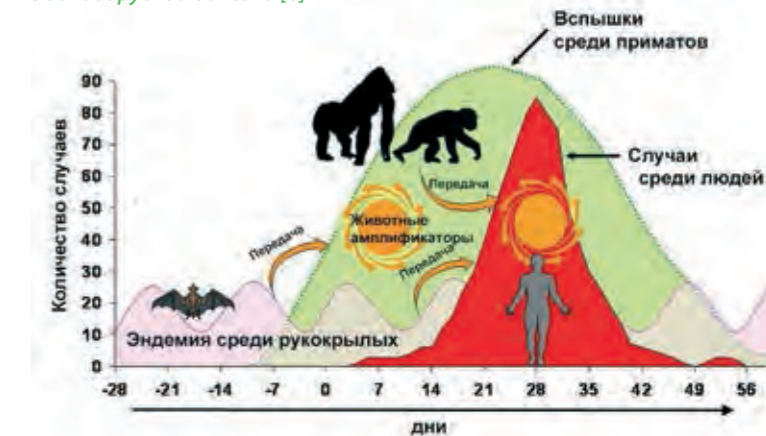
Нарастающая по мере удаления от сбалансированной системы тяжесть течения ЭВБ и летальность находит элементарное объяснение в канонических представлениях о роли патогенности возбудителей в паразитарной системе: чем «дальше» от нее, тем тяжелее патология [2].

Структура, сукцессия паразитарной системы и динамика эпидемического процесса при ЭВБ представлены на рис. 4 и 5.

Рис. 4. Структура и сукцессия паразитарной системы Эболавирусной болезни [6]



Рис. 5. Динамика эпидемического процесса при Эболавирусной болезни [6]



Настораживающим фактом явилось обнаружение чувствительности к Эболавирусной инфекции домашних свиней [4]. Вирус субтипа Рестон изолирован при вспышках репродуктивно-респираторного синдрома свиней на Филиппинах в 2008–2009 гг., показана их восприимчивость при экспериментальном заражении вирусом субтипа Заир, который размножался в организме свиней и был способен к передаче между ними. Более того, установлено спонтанное инфицирование человека при экспозиции с зараженными свиньями (работников свиноферм и убойных предприятий) [4, 7].

Таким образом, свиноводческие фермы в неблагополучных зонах могут становиться потенциальным амплификатором ЭВБ уже в антропогенных условиях, и этот фактор риска требует необходимого внимания. С этой целью рекомендовано устанавливать наличие свиноферм в зоне неблагополучия, контролировать и профилировать возможность передачи инфекции по типу «свинья → человек», включая контроль производства пищевых продуктов свиного происхождения, устанавливать присутствие вируса у свиней, применять меры биобезопасности для исключения контактов «летучие мыши → свиньи» для предотвращения передачи Эболавирусной инфекции в свинные популяции. В частности, службам ветеринарного надзора и здравоохранения в зонах регистрации болезни рекомендованы конкретные меры контроля этого фактора риска [7]:

- ♦ установление системы клинического и серологического мониторинга на свинофермах для быстрой идентификации Эболавирусной инфекции среди свиней;

- ♦ при выявлении инфекции у свиней — немедленное оповещение компетентных органов здравоохранения для создания специальной предупредительной программы мероприятий;

- ♦ в подтвержденных случаях циркуляции Эболавируса в популяции свиней — применение радикальных мер искоренения (убой животных и уничтожение туш, компенсация потерь владельцев, ограничения и контроль за перемещениями свиней в инфицированной зоне, карантинирование ферм, прочие меры, рекомендованные международными стандартами и правилами);

- ♦ для предупреждения передачи Эболавирусной инфекции на другие свинофермы путем трансмиссии «животные → человек → животные»:

- недопущение прямого контакта с кровью и органами инфицированных свиней, утилизации или переработки туш или плодов без соответствующего обезвреживания;

- применение надежных средств защиты персонала (спецодежда) при работе на инфицированных фермах с различными биоматериалами (животные, туши, плоды, плаценты) и их утилизации;

- кулинарная обработка всех продуктов животного происхождения (кровь, мясо, молоко);

- ♦ ужесточение контроля за производством пищевых продуктов свиного происхождения для исключения возможности попадания контаминированной свинины в потребительские цепи;

- ♦ привлечение внимания к проблеме Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), международное сотрудничество свиноводов, производителей, экспортеров в профилактике рисков трансграничного распространения ЭВБ.

В качестве заключения следует отметить возрастающее значение нетривиальных путей и причин эмерджентного возникновения и распространения новых инфекций и зоонозов, таких как психосоциальные, ритуальные, культовые, религиозные факторы, национальные традиции и привычки [3, 7, 8]. Для этой группы заболеваний ВОЗ предложено общее название *cultural-related diseases* — болезни, обусловленные особенностями культуры. Примеров подобных ассоциаций достаточно, чтобы не считать это явление исключением в современной ветеринарной и гуманитарной эпидемиологии. В частности, это прионная инфекция Куру и ритуальный каннибализм у папуасов Новой Гвинеи, вирус иммунодефицита человека, половые извращения и наркотики в цивилизованных странах, вирусные гепатиты В и С, другие гемоконтактные инфекции и переливание крови повсеместно, атипичная пневмония и употребление в пищу виверр в Китае, птичий грипп и кухонная обработка живой инфицированной птицы на юго-востоке Азии.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают признательность студентам ветеринарного отделения Российского университета дружбы народов Вадиму Родионову, Шиловой АLINE и Ольге Татушиной за помощь в сборе и подготовке материалов по теме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геморрагические лихорадки. — URL: <http://med-enc.narod.ru/infekciya/060.html>.
2. Макаров В.В., Бакулов И.А. О роли патогенности микроорганизмов в инфекционной паразитарной системе // Вестник с.-х. науки. — 1990. — № 7. — С. 92–97.
3. Эмерджентность, чрезвычайные ситуации и зоонозы / В.В. Макаров, А.М. Смирнов, В.В. Сочнев [и др.] // Ветеринарная патология. — 2004. — № 3 (10). — С. 36–45.
4. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus / R. Barrette, S. Metwally, J. Rowland [et al.] // Science. — 2009. — Vol. 325, № 5937. — P. 204–206.
5. Filovirus infections / V. Wahl-Jensen, C. Peters, P. Jahrling [et al.] // Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice / ed. L. Richard [et al.]. — 3rd ed. — Philadelphia, PA, Elsevier, JAMA, 2011. — P. 483–491.
6. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus / E. Leroy, B. Kumulungui, X. Pourrut [et al.] // Nature. — 2005. — Vol. 438. — P. 575–576.
7. WHO. Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation. — Geneva, Switzerland, Aug. 2014. — 123 p.
8. WHO. Ebola Filovirus. — URL: <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/>.
9. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Vol. II. Chlamydioses, Rickettsioses and Viroses. — 3rd ed. — PAHO, 2003. — 416 p.

УДК 619:616.98:578.842.1:616-076

РЕЗУЛЬТАТЫ УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНЫХ СЛИЧИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЯХ ПО ДИАГНОСТИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

А.М. Тимина¹, М.Р. Якупов², А.В. Щербakov³

¹ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: timina@arriah.ru

² аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: vavilova@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье описаны результаты участия референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ» в XI международных сличительных испытаниях по диагностике африканской чумы свиней, организованных Референтной лабораторией по АЧС Европейского Союза (URL-CISA-INIA, Мадрид, Испания). В ходе испытаний был правильно определен инфекционный статус всех закодированных проб. Результаты испытаний свидетельствуют о том, что разработанные и используемые в лаборатории тест-системы на основе ИФА и ПЦР обладают высокой чувствительностью и специфичностью и обеспечивают достоверные результаты при проведении диагностики африканской чумы свиней.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.

UDC 619:616.98:578.842.1:616-076

RESULTS OF PARTICIPATION IN INTERNATIONAL PROFICIENCY TESTING ON AFRICAN SWINE FEVER DIAGNOSTICS

A.M. Timina¹, M.R. Yakupov², A.V. Scherbakov³

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: timina@arriah.ru

² PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: vavilova@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

SUMMARY

Results of participation of the FGBI «ARRIAH» Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases in the XI International Proficiency Testing on African Swine Fever Diagnostics arranged by the European Union Reference Laboratory for ASF (URL-CISA-INIA, Madrid, Spain) are described in the paper. As part of the testing the infectious status of all coded samples was correctly determined. Testing results show that used in the Laboratory test-systems on the basis of ELISA and PCR have high sensitivity and specificity and provide highly reliable results during African swine fever diagnostic procedure.

Key words: African swine fever, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является возбудителем особо опасного заболевания, характеризующегося острой геморрагической лихорадкой и большой летальностью.

АЧС эндемична в Африке, на Мадагаскаре и о. Сардиния (Италия). Более 30 лет (в 1960–1990 гг.) болезнь была распространена в Португалии и Испании. Спорадические вспышки АЧС, вызванные заносом инфекции, регистрировались во второй половине 20 столетия в некоторых других странах Европы (Франции, Бельгии, Нидерландах), а также на Кубе, в Бразилии, Гаити и Доминиканской Республике [2]. В Россию болезнь проникла в ноябре 2007 г. из Грузии. С 2007 г. продолжается распространение АЧС среди диких кабанов и домашних свиней на территории европейской части России.

До 2011 г. чума обнаруживалась в Северо-Кавказском и Южном федеральных округах, а в 2012–2013 гг. распространилась и на территориях Центрального и Северо-Западного федеральных округов.

В связи с тем, что вакцины против АЧС на сегодняшний день не разработаны, меры борьбы с болезнью ограничиваются ранней постановкой диагноза с последующим уничтожением инфицированных животных и животных, находящихся в угрожаемой зоне. В этих условиях первостепенное значение отводится методам быстрой и высокоспецифичной диагностики АЧС.

В референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ» для диагностики АЧС используется комплекс методов. Для обнаружения вируса АЧС в биологическом материале применяется стандартная ПЦР и ПЦР в реальном времени. Для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней разрабо-

тан непрямого варианта ИФА, основанный на использовании в качестве антигена рекомбинантных белков р30 [1] и рК205R.

В апреле 2014 г. лаборатория принимала участие в XI международных сравнительных испытаниях, проводимых Референтной лабораторией по АЧС Европейского союза (URL-CISA-INIA, Мадрид, Испания). В данной статье описаны результаты сравнительных испытаний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы. Для участия в международных сравнительных испытаниях из Референтной лаборатории по АЧС Европейского союза (URL-CISA-INIA, Мадрид, Испания) была получена панель инактивированных образцов для тестирования, включающая 11 лиофилизированных сывороток крови и 8 гомогенизированных лиофильно высушенных тканей. Образцы были закодированы, характеристика образцов (табл. 1) стала известна участникам после завершения испытаний.

ПЦР и ПЦР-РВ. Панели сывороток и тканей исследовали методами стандартной ПЦР и ПЦР в реальном времени. Стандартную ПЦР проводили по методике М. Агуэго с соавт., 2003 [5], ПЦР-РВ — по методике D.P. King с соавт., 2003 [4]. Обе методики рекомендованы OIE (Всемирной организацией здравоохранения животных) для диагностики АЧС.

ИФА. Сыворотки крови исследовались на наличие антител к вирусу АЧС в р30-ИФА [1] и рК205R-ИФА, разработанных в референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также в коммерческом наборе INGEZIM PPA COMPAC 11.PPA.K3 (Ingensa, Испания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Панели тканей и сывороток крови были исследованы на наличие ДНК вируса АЧС, а сыворотки крови тестировались также на наличие антител к вирусу.

Для обнаружения ДНК вируса АЧС применяли стандартную ПЦР с электрофоретической детекцией результатов и ПЦР в реальном времени. Методом стандартной ПЦР ДНК вируса АЧС была обнаружена в трех

образцах сывороток крови (№№ 2, 8, 11) и пяти образцах тканей (№№ 1, 2, 4, 6, 7) (рис. 1).

Все пробы, показавшие положительный результат в стандартной ПЦР, подтвердили свой инфекционный статус и в ПЦР в реальном времени (рис. 2). Однако сыворотка № 6, показавшая в стандартной ПЦР отрицательный результат, была положительной в ПЦР-РВ. Полученное разногласие, вероятно, объясняется низкой концентрацией вируса в пробе С6 и меньшей чувствительностью стандартной ПЦР по сравнению с ПЦР-РВ.

Таким образом, по результатам исследований в двух вариантах ПЦР положительными на АЧС были признаны 4 пробы сывороток и 5 проб тканей.

На наличие антител к вирусу АЧС сыворотки крови проверяли методом иммуноферментного анализа. При этом использовали три тест-системы: р30-ИФА и рК205R-ИФА, разработанные в ФГБУ «ВНИИЗЖ», а так-

Таблица 1
Описание панели образцов

№ пробы	Клиническая форма АЧС	Вирулентность вируса АЧС	Изолят вируса АЧС	Генотип вируса АЧС	Происхождение	
					ДПИ	описание
C1	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
C2	острая	вирулентный	Ukr12/Zapo	II	7	Украинский 10 ГАЕ/мл
C3	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
C4	хроническая	аттенуированный	NH/P68	I	107	Португальский NH/P68 10 ³ ТЦД ₅₀ /мл
C5	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
C6	острая	вирулентный	NH/P68- L60-Arm07	I–II	9 после заражения изолятом Армения 07	Португальский NH/P68 10 ⁵ ТЦД ₅₀ /мл + Португальский L60 10 ГАЕ/мл + Армения 07
C7	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
C8	острая	вирулентный	L60	I	7	Португальский L60 10 ГАЕ/мл
C9	подострая	умеренный	Ken05/Tk1	X	70	Кенийский Ken05/Tk1 10 ГАЕ/мл
C10	хроническая	аттенуированный	NH/P68-L60	I	22	Португальский NH/P68 10 ⁵ ТЦД ₅₀ /мл + Португальский L60 10 ГАЕ/мл
C11	хроническая	аттенуированный	NH/P68	I	34	Португальский NH/P68 10 ⁵ ТЦД ₅₀ /мл
T1	острая	вирулентный	Ukr12/Zapo	II	5	Украинский 10 ГАЕ/мл, селезенка
T2	подострая	умеренный	Ken05/Tk1	X	18	Кенийский Ken05/Tk1 10 ГАЕ/мл, лёгкие
T3	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
T4	острая	вирулентный	Ken06.Bus	IX	16	Кенийский Ken06.Bus 10 ГАЕ/мл, сердце
T5	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					
T6	острая	вирулентный	Arm07	II	9	Армения 07 10 ГАЕ/мл, почки
T7	острая	вирулентный	L60	I	7	Португальский 10 ГАЕ/мл, лёгкие
T8	здоровая свинья (не инфицированная вирусом АЧС)					

С — сыворотка;
Т — ткань;
ДПИ — дни после инфицирования.

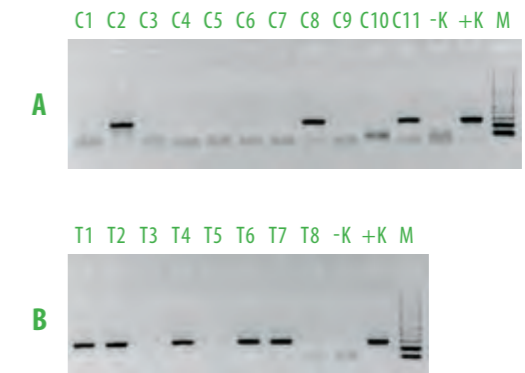


Рис. 1. Обнаружение ДНК вируса АЧС в пробах сывороток крови (А) и тканей (Б) методом стандартной ПЦР
C1–C11 — образцы инактивированных сывороток; T1–T8 — образцы инактивированных тканей; -K, +K — отрицательный и положительный контролли; M — маркер молекулярного веса ДНК.

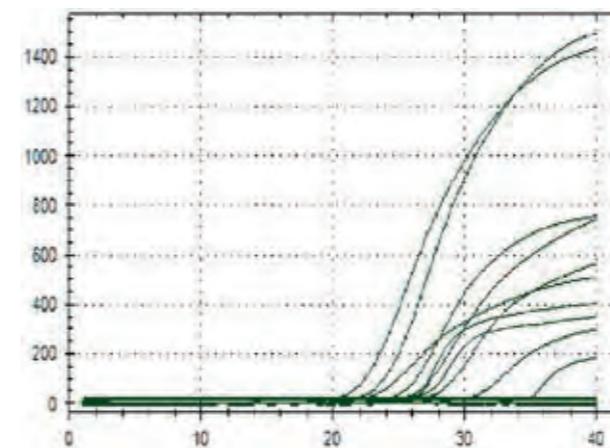


Рис. 2. Обнаружение ДНК вируса АЧС в пробах сыворотки крови и тканей методом ПЦР в реальном времени

№ лунки	флюорофор	Характеристика пробы	Сt
C01	HEX	сыворотка 1	N/O
C02	HEX	сыворотка 2	20,19
C03	HEX	сыворотка 3	N/O
C04	HEX	сыворотка 4	N/O
C05	HEX	сыворотка 5	N/O
C06	HEX	сыворотка 6	34,43
C07	HEX	сыворотка 7	N/O
C08	HEX	сыворотка 8	24,21
C09	HEX	сыворотка 9	N/O
C10	HEX	сыворотка 10	N/O
C11	HEX	сыворотка 11	30,18
D01	HEX	ткань 1	25,49
D02	HEX	ткань 2	24,73
D03	HEX	ткань 3	N/O
D04	HEX	ткань 4	26,85
D05	HEX	ткань 5	N/O
D06	HEX	ткань 6	24,87
D07	HEX	ткань 7	22,22
D08	HEX	ткань 8	N/O
D09	HEX	отр контроль	N/O
D10	HEX	пол контроль	21,61

Таблица 2
Обнаружение антител к вирусу АЧС в пробах сыворотки крови свиней методом ИФА

Шифр пробы	Результаты ИФА (ПП — процент позитивности)		
	р30-ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	рК205R-ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)	Ingezim PPA Compac (Ingenaza, Испания)
C1	0%	0%	20%
C2	0%	4%	11%
C3	0%	0%	20%
C4	81%	44%	101,3%
C5	0%	0%	20%
C6	103%	100%	100,6%
C7	0%	0%	12%
C8	0%	6,4%	0%
C9	97%	90,7%	100,4%
C10	88%	97,9%	100%
C11	40,3%	91,2%	100%

р30-ИФА и рК205R-ИФА: ПП>25% — положительный, ПП<20% — отрицательный, ПП>20%<25% — сомнительный результат; Ingezim PPA Compac: ПП>50% — положительный, ПП<40% — отрицательный, ПП>40%<50% — сомнительный результат.

же коммерческий набор Ingezim PPA Compac (Ingenaza, Испания). Все тест-системы выявили антитела в 5 из 11 зашифрованных образцов (табл. 2).

По результатам обнаружения ДНК вируса АЧС и антител к вирусу определялся инфекционный статус каждой пробы, т.е. ставился заключительный диагноз. Форма заключительного диагноза была установлена организатором сличительных испытаний. Заполненная форма, содержащая полученные нами результаты, приведена в табл. 3 в переводе на русский язык. Как

Таблица 4
Сравнительные результаты обнаружения ДНК вируса АЧС в образцах тканей

Участник испытаний	Результаты по образцам тканей								Метод исследования
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
ФГБУ «ВНИИЗЖ»	пол.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	пол.	отр.	ОИЕ-ПЦР
	25,5	24,7	н.о.	26,9	н.о.	24,9	22,2	н.о.	ОИЕ ПЦР-РВ
	пол.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	пол.	отр.	заключение
URL	пол.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	пол.	отр.	ОИЕ-ПЦР
	25,8	24,7	н.о.	27,0	н.о.	22,7	23,7	н.о.	ОИЕ ПЦР-РВ
	25,7	24,1	н.о.	27,5	н.о.	24,0	23,1	н.о.	URL-ПЦР
	пол.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	пол.	отр.	заключение

Таблица 3
Итоговая таблица результатов исследований с заключительным диагнозом на АЧС

Образцы	Обнаружение антител	Обнаружение вируса	Заключительный диагноз на АЧС	
Сыворотки	1	отрицательно	отрицательно	отрицательный
	2	отрицательно	положительно	положительный
	3	отрицательно	отрицательно	отрицательный
	4	положительно	отрицательно	положительный
	5	отрицательно	отрицательно	отрицательный
	6	положительно	положительно	положительный
	7	отрицательно	отрицательно	отрицательный
	8	отрицательно	положительно	положительный
	9	положительно	отрицательно	положительный
	10	положительно	отрицательно	положительный
	11	положительно	положительно	положительный
Ткани	1		положительно	положительный
	2		положительно	положительный
	3		отрицательно	отрицательный
	4		положительно	положительный
	5		отрицательно	отрицательный
	6		положительно	положительный
	7		положительно	положительный
	8		отрицательно	отрицательный

видно из табл. 3, положительный диагноз на АЧС был поставлен для 12 из 19 исследованных образцов.

Заполненная форма в установленный срок была отправлена организатору сличительных испытаний, и в мае 2014 г. из URL (Референтной лаборатории по АЧС Европейского союза) был получен отчет, содержащий анализ результатов, полученных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Отчет содержал описание закодированных проб (табл. 1), а также сравнивал наши результаты с референтными результатами, полученными в URL.

В таблицах 4 и 5 сравниваются результаты двух лабораторий, полученные методами стандартной ПЦР и ПЦР-РВ для проб тканей и сывороток соответственно. По пробам тканей результаты двух лабораторий

Таблица 5
Сравнительные результаты обнаружения ДНК вируса АЧС в образцах сывороток

Участник испытаний	Результаты по образцам сывороток											Метод исследования
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	
ФГБУ «ВНИИЗЖ»	отр.	пол.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	отр.	пол.	ОИЕ-ПЦР
	н.о.	20,2	н.о.	н.о.	н.о.	34,4	н.о.	24,2	н.о.	н.о.	30,2	ОИЕ ПЦР-РВ
	отр.	пол.	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	отр.	пол.	заключение
URL	отр.	пол.	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	отр.	пол.	ОИЕ-ПЦР
	н.о.	24,7	н.о.	н.о.	н.о.	32,9	н.о.	24,4	н.о.	н.о.	30,7	ОИЕ ПЦР-РВ
	н.о.	20,3	н.о.	39,3	н.о.	33,1	н.о.	24,0	38,3	37,9	32,7	URL-ПЦР
	отр.	пол.	отр.	сл. пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	сл. пол.	сл. пол.	пол.	заключение

Таблица 6
Сравнительные результаты выявления антител к вирусу АЧС методом ИФА

Участник испытаний	Результаты по образцам сывороток											Метод исследования
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	
ФГБУ «ВНИИЗЖ»	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	INGENASA K3
	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	р30-ИФА рК205R-ИФА
	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	
URL	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	отр.	пол.	пол.	пол.	INGENASA K3
	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	отр.	пол.	пол.	пол.	URL-ELISA

полностью совпадают. По сывороткам разногласие наблюдалось в отношении пробы C6: у нас она была положительной только в ПЦР-РВ, а в URL — в обоих вариантах ПЦР.

Для обнаружения ДНК вируса АЧС испанцы применяли две модификации ПЦР в реальном времени: так называемую ОИЕ-ПЦР-РВ (King et al., 2003) [4], метод, который рекомендует ОИЕ, и недавно разработанную URL-ПЦР-РВ (Fernandez et al., 2013) [6]. В URL-ПЦР-РВ слабо положительными были пробы C4, C9 и C10, которые в ОИЕ-ПЦР-РВ показали отрицательный результат у нас, и у испанцев.

Полученные результаты ставят вопрос об изучении необходимости перехода от ОИЕ-ПЦР-РВ к URL-ПЦР-РВ как возможно более чувствительному методу.

Сравнение результатов ИФА, полученных в ФГБУ «ВНИИЗЖ», с результатами URL показано в табл. 6. Испанцы использовали две тест-системы: коммерческий набор фирмы Ingenaza и набор собственного производства (URL-ELISA), который ОИЕ рекомендует в качестве референтного теста для выявления антител к вирусу АЧС. Как видно из таблицы, результаты двух лабораторий полностью совпадают.

Полученные результаты подтверждают, что разработанные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» р30-ИФА и рК205R-ИФА позволяют достоверно определять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

Этот вывод приобретает особое значение, учитывая результаты сравнения различных коммерческих тест-систем. Сотрудники URL исследовали референтные сыворотки в трех коммерческих тест-системах и показали, что только набор Ingezim PPA Compac (Ingenaza,

Испания) обеспечивает достоверный диагноз, тогда как в наборе ID Screen® African Swine Fever (IDVET) был получен один ложноотрицательный результат, а в наборе ID SVANOVIR® ASFV-Ab (Svanova, Швеция) — четыре ложноположительных результата (табл. 7).

Итоговая сравнительная таблица результатов (табл. 8) свидетельствует о том, что заключительный диагноз по каждому образцу, сделанный двумя лабораториями, полностью совпадает.

ВЫВОДЫ

В ходе сличительных испытаний был правильно определен инфекционный статус всех закодированных образцов тканей и сывороток крови, по каждой пробе правильно поставлен заключительный диагноз на АЧС.

Применяемые в ФГБУ «ВНИИЗЖ» тесты для диагностики АЧС на основе ПЦР и ИФА обеспечивают достоверные результаты, сравнимые с результатами аналогичных тестов, используемых в Референтной лаборатории по АЧС Европейского Союза.

Первый опыт участия ФГБУ «ВНИИЗЖ» в международных сличительных испытаниях по диагностике АЧС можно признать успешным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Использование рекомбинантного белка р30 вируса африканской чумы свиней в непрямом варианте иммуноферментного анализа / М.Р. Якупов, А.С. Яковлева, А.В. Каньшина, А.В. Щербаков // Ветеринария. — 2014. — в печати.
2. African swine fever, Mauritius. Promed. — 2007. — URL <http://www.afriquenligne.fr/news/daily-news/>

thousands-of-pigs-killed-in-mauritius-2007102010912 (дата обращения 25.04.14).

3. African swine fever // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 2012. — Vol. 2, Chap. 2.8.1. — P. 1067–1079.

4. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus / D.P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings [et al.] // J. Virol. Meth. — 2003. — Vol. 107. — P. 53–61.

5. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples / M. Agüero, J. Fernandez, J. Romero, [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 4431–4444.

6. Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library / J. Fernández-Pinero, C. Gallardo, M. Elizalde [et al.] // Transbound. Emerg. Dis. — 2013. — Vol. 60, № 1. — P. 48–58.

УДК 619:616.98:578.823.1

О СЛУЧАЯХ ВЫЯВЛЕНИЯ ВАКЦИНОПОДОБНОГО ВИРУСА БЛЮТАНГА 14-ГО СЕРОТИПА В РФ И В СТРАНАХ ЕВРОПЫ В 2011–2012 ГГ.

В.М. Захаров¹, А.В. Кононов², В.А. Мищенко³

¹ эксперт, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zaharov@arriah.ru

² заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Таблица 7

Результаты обнаружения антител к вирусу АЧС в образцах инактивированных сывороток различными методами

Метод обнаружения антител	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	
ИФА	URL-ELISA	-	-	-	+	-	+++	-	-	+++	+++	+
	INGENASA K3	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	+++	++
	IDVET	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	сом.	л.о.
	SVANOVIR	л.п.	-	л.п.	++	л.п.	+++	л.п.	-	+++	+++	++
Методы для подтверждения	URL-IB	-	-	-	++	-	+++	-	-	+++	+++	+++
	URL-IPT	-	-	-	++	-	+++	-	+	+++	+++	+++
Заключение URL о наличии антител к вирусу АЧС	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	сл. пол.	пол.	пол.	пол.	пол.

URL-ELISA — непрямой метод ИФА [3];

INGENASA K3 — коммерческий набор ИФА Ingezim PPA Compac (11.PPA k3);

IDVET — коммерческий набор ИФА ID Screen[™] African Swine Fever. Непрямой метод ИФА на основе рекомбинантных белков P32, P62 and P72;

SVANOVIR — коммерческий набор ИФА ID SVANOVIR[™] ASFV-Ab. Непрямой метод ИФА на основе рекомбинантного белка P32;

URL-IB — иммуноблоттинг [3] для подтверждения положительных и сомнительных ИФА образцов;

URL-IPT — непрямой иммунопероксидазный метод на культуре клеток BA71V-VERO для подтверждения положительных и сомнительных ИФА-образцов;

л.п. — ложноположительный результат;

л.о. — ложноотрицательный результат.

Таблица 8

Сравнение заключительных результатов исследований

	Обнаружение антител		Обнаружение вируса		Заключительный диагноз на АЧС	
	URL	ФГБУ «ВНИИЗЖ»	URL	ФГБУ «ВНИИЗЖ»	URL	ФГБУ «ВНИИЗЖ»
C1	отр.	отр.	отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
C2	отр.	отр.	пол.	пол.	положительный	положительный
C3	отр.	отр.	отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
C4	пол.	пол.	сл. пол.	отр.	положительный	положительный
C5	отр.	отр.	отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
C6	пол.	пол.	пол.	пол.	положительный	положительный
C7	отр.	отр.	отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
C8	сл. пол.	отр.	пол.	пол.	положительный	положительный
C9	пол.	пол.	сл. пол.	отр.	положительный	положительный
C10	пол.	пол.	сл. пол.	отр.	положительный	положительный
C11	пол.	пол.	пол.	пол.	положительный	положительный
T1			пол.	пол.	положительный	положительный
T2			пол.	пол.	положительный	положительный
T3			отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
T4			пол.	пол.	положительный	положительный
T5			отр.	отр.	отрицательный	отрицательный
T6			пол.	пол.	положительный	положительный
T7			пол.	пол.	положительный	положительный
T8			отр.	отр.	отрицательный	отрицательный

РЕЗЮМЕ

В статье проанализированы случаи выявления блютанга 14-го серотипа в европейских странах и РФ в 2011–2012 гг., связанные с выделением вакциноподобного аттенуированного вируса блютанга.

Ключевые слова: блютанг, серотипы вируса, живые вакцины.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема блютанга продолжает привлекать пристальное внимание ветеринарных специалистов [1, 3, 4, 10, 28] в связи с широким географическим распространением болезни в мире и, в частности, в Европе. Так, по данным МЭБ и Нотификационной системы ЕС по болезням животных [11, 27] на конец сентября 2014 г. только в европейских странах отмечено появление свыше 2,6 тысячи очагов блютанга серотипов 1 и 4, который регистрировался в Албании, Болгарии, Боснии и Герцеговине, Греции, Испании, Италии, Македонии, Румынии, Сербии и Турции.

Но прежде всего интерес к болезни связан с беспрецедентным расширением нозоареала блютанга из эндемичных регионов Африки и Азии в северном направлении, когда граница ареала вместо привычных 40° с.ш. сдвинулась до 58° с.ш. (Швеция, Норвегия). Проникновение вируса блютанга различных серотипов в европейские страны отмечено с октября 1998 г., а в 2006 г. блютангом 8-го серотипа были поражены практически все страны Северо-Западной Европы. Пик интенсивности проявления болезни пришелся на 2007–2008 гг., когда было выявлено более 60 тысяч очагов. Массовые вспышки болезни регистрировались и в последующие годы, но уже в 2011 г. было выявлено всего лишь 39 очагов болезни (Греция, Италия, Испания, Португалия, Кипр).

Подробный эпизоотологический анализ ситуации по блютангу в этот период дан профессором В.В. Макаровым с соавт. в цикле специальных публикаций на эту тему, в том числе и на страницах журнала «Ветеринария сегодня» [2, 6, 7, 8, 9, 10].

Цель настоящей статьи — анализ данных международных информационных систем по официальным источникам МЭБ, ФАО, ЕС о случаях регистрации в странах Европы и Российской Федерации в 2011–2012 гг. блютанга 14-го серотипа, так как, на наш взгляд, эти материалы не получили должного отражения в отечественной научной печати.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О выявлении в России блютанга 14-го серотипа в печати впервые сообщили сотрудники ГНУ «ВНИИВВиМ» (г. Покров), осуществляющего мониторинг блютанга среди импортируемых в страну племенных животных, в информации, представленной на Ежегодной конференции EPIZONE в июне 2012 г., а также в декабре 2012 г. на ежегодном Международном совещании референтных лабораторий по блютангу в Великобритании [14, 16].

29 августа 2011 г. в ООО «Племенной центр Смоленский Галловей» из Германии (Hagen) была ввезена партия крупного рогатого скота (КРС). На территории Германии животные 8–20 августа исследовались на блютанг в ИФА и ПЦР с негативным результатом. Животных завозили через Польшу и Белоруссию.

По прибытии в Смоленскую область 29 августа животные были помещены в карантин, где 2 сентября 2011 г. были исследованы во ВНИИВВиМ на блютанг в ИФА и ПЦР также с отрицательным результатом.

При повторных серологических исследованиях 28 сентября 2011 г. из 71 головы КРС специфические антитела к вирусу блютанга обнаружены у 5, а в ПЦР были позитивными 4 головы КРС. Последующие серо-

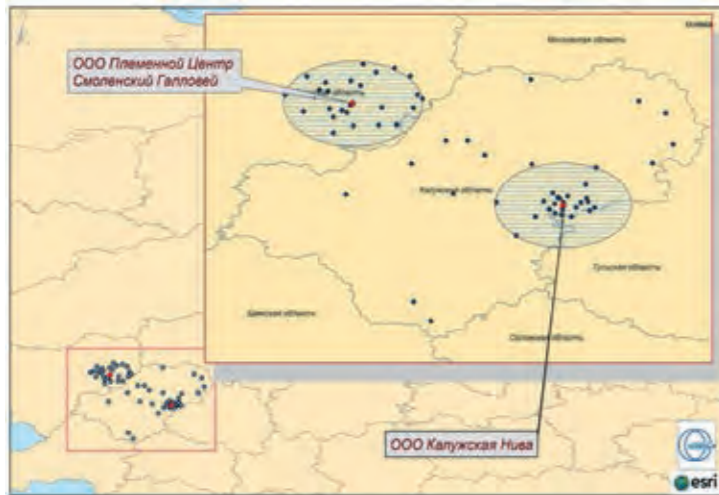


Рис. 1. Места выявления серопозитивного на блютанг крупного и мелко рогатого скота в Смоленской и Калужской областях (ВНИИВВиМ)

логические исследования проб от выявленных животных в течение 4 месяцев показали выраженное повышение уровня антител.

26 января 2012 г. в крови коров был выявлен геном вируса блютанга, но при типировании с диагностикумами 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 и 16 серотипов он не был идентифицирован.

Выделенную РНК отправили в Институт им. Ф. Леффлера (Германия), где был установлен блютанг серотипа 14.

В январе 2012 г. в культуре Vero и на ягнятах во ВНИИВВиМ выделен вирус, типированный в РН как 14-й серотип, о чем было сообщено в МЭБ 14 марта 2012 г.

В июле 2012 г. патматериал был также направлен в Референтную лабораторию ЕС по блютангу (Пербрайт, Великобритания), где 22 ноября 2012 г. была подтверждена принадлежность вируса к 14-му серотипу [26]. Штамм, обозначенный как RUS2011/01, оказался на 99,9% идентичным вакцинному штамму BTV-14RSArrrr/14, входящему в состав коммерческой поливалентной аттенуированной вакцины ЮАР (Onderstepoort Biological Products (OBP — South Africa) из первичного флакона А, содержащего вирусы блютанга серотипов 1, 4, 6, 12 и 14.

По результатам скрининговых исследований на блютанг, проведенных ВНИИВВиМ в Смоленской и Ка-

Рис. 2. Регионы выявления серопозитивных на блютанг животных в Литве [22]



лужской областях в 2012 г., было выявлено большое количество позитивных на блютанг животных (рис. 1).

Эти данные позволили сотрудникам ВНИИВВиМ на конференции референтных лабораторий по блютангу в декабре 2012 г. высказать предположение, что вирус блютанга 14-го серотипа циркулирует в западной части Российской Федерации по крайней мере два последних года, тем более что систематические исследования на блютанг не проводились среди местного скота [16].

При эпизоотологическом обследовании ферм КРС в Смоленской и Калужской областях, проведенном сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ», случаев клинического проявления блютанга не выявлено.

Руководство Россельхознадзора в неоднократных обращениях в Гендиректорат Еврокомиссии по здравоохранению и защите потребителей выражало серьезную обеспокоенность в связи с выявлением у импортированных из Германии животных вируса блютанга 14-го серотипа.

Практически одновременно Прибалтийские государства и Польша сообщили о выявлении на их территориях животных, позитивных на блютанг 14-го серотипа.

Европейская комиссия по здоровью и благосостоянию животных на своем сайте [22] в декабре 2012 г. сообщила, что Литва при обращении в Комиссию ЕС от 13 ноября 2012 г. уведомила о выявлении на территории страны КРС, позитивного на блютанг 14-го серотипа. Было исследовано 51 животное, содержащееся на 27 фермах в различных районах. Ни у одного из них не было клинических признаков блютанга, все пробы крови были отрицательны в ПЦР, но в 15 пробах были выявлены антитела к вирусу блютанга. 23–25 ноября было исследовано 280 проб крови от КРС, при этом 64 животных были серопозитивными, но все пробы были негативными в ПЦР.

Регионы Литвы, где были выявлены животные, серопозитивные на блютанг, показаны на рис. 2.

Необходимо также отметить, что на заседании Европейской комиссии по здоровью и благосостоянию животных 4 декабря 2012 г. [21, 24] представителями Испании было доложено, что среди скота, завезенного из Литвы, 9 животных оказались ПЦР-позитивными по блютангу 14-го серотипа, данные были подтверждены при исследовании проб крови в Пербрайте. Позитивно реагирующие животные были уничтожены.

Латвия на заседании Комиссии ЕС 30 ноября 2012 г. сообщила, что, начиная с сентября 2012 г., в стране выявлено значительное количество КРС, серопозитивного по блютангу. Так, из 6988 голов КРС серопозитивными оказались 206 голов, из них родившихся в 2012 г. — 54. Как правило, в стадах выявлялось по 1–2 серопозитивных животных, все животные были негативными на блютанг в ПЦР, так же как и не отмечалось клинического проявления болезни. Кровь серопозитивных животных была направлена в Пербрайт, где 27 ноября 2012 г. подтвердили инфицированность животных вирусом блютанга 14-го серотипа.

Географическое расположение ферм с серопозитивными на блютанг животными в Латвии представлено на рис. 3.

Как видно из рис. 3, фермы с серопозитивными на блютанг животными расположены практически на всей территории Латвии.

Эстония факсом от 22 ноября 2012 г. уведомила Комиссию ЕС о выявлении серопозитивных на блютанг животных в регионе Saare (рис. 4) без дополнительных разъяснений.

О подозрении на наличие блютанга среди КРС еще в январе 2012 г. сообщала в ЕС и Польша [22], которая направила в Пербрайт пробы крови КРС. Однако четких результатов исследований не было получено. В дальнейшем, при мониторинговых исследованиях в рамках Национальной программы по надзору за блютангом в III квартале 2012 г., геном вируса блютанга был выявлен в крови животных 3 ферм в пограничном с Литвой и Белоруссией районе (рис. 5).

Референтная лаборатория в Пербрайте [26] подтвердила инфицированность животных в Польше, Латвии и Литве вирусом блютанга 14-го серотипа. Вирус на 100% был идентичен референтному вакцинному штамму BTV-14 South Africa, входящему в состав коммерческой мультивалентной аттенуированной вакцины, выпускаемой предприятием Onderstepoort Biological Products (OBP — South Africa), и на 99,9% соответствовал российскому штамму RUS2011/01, выделенному в Смоленской области.

В целом, оценка ситуации по блютангу серотипа 14, сложившейся в ряде стран, в том числе и России, предполагает о предполагаемом источнике заражения животных представляются отнюдь не однозначными.

Так, по официальным данным Референтной лаборатории ЕС по блютангу в Пербрайте эпизоотический вирус данного серотипа циркулирует только в США, странах Центральной и Южной Америки, в Африке (таблица). Наличие антител к вирусу данного серотипа было выявлено среди животных в странах Среднего Востока, Пакистане, Индии.

Естественно, встает вопрос и о том, откуда мог появиться вирус 14-го серотипа на территории Российской Федерации. Самое простое предположение — вирус был занесен с импортными животными из Германии. Но при этом нельзя упускать из внимания тот факт, что импортированные в августе 2011 г. животные дважды с отрицательным результатом на блютанг исследовались в Германии, а затем с таким же отрицательным результатом — в карантине на территории Смоленской области. И лишь при повторных исследованиях 28 сентября у животных были выявлены антитела к вирусу блютанга.

Возникает вполне закономерный вопрос, а не были ли животные инфицированы уже на территории Смоленской области по прибытии из Германии?

Департамент окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании [15], проводящий прогнозные исследования в связи с распространением заразных болезней животных, высказал предположение, что вакцинный вирус мог быть скорее всего занесен с вакцинированными животными из региона, где циркулирует вирус 14-го серотипа. В качестве такой страны-экспортера животных названы США, где могли применять живую вакцину, содержащую вирус данного серотипа. Подчеркивалось, что страны ЕС, в том числе и Польша и Прибалтийские страны, не завозили живых животных из США, но такие животные импортировались в последние годы в Россию.

Необходимо также отметить, что ни в одном случае ни в России, ни в Польше и Прибалтийских странах при выявлении животных, серопозитивных или ПЦР-позитивных на блютанг 14-го серотипа, клинического проявления болезни не отмечалось.

Случаи выявления циркуляции вакциноподобных вирусов блютанга в ходе эпизоотии болезни регистрировались и ранее. Так, в Нидерландах и Германии в октябре–ноябре 2008 г. в ходе эпизоотии блютанга,



Рис. 3. Географическое размещение ферм с серопозитивными на блютанг животными в Латвии [20]

вызванного вирусом 8-го серотипа, у КРС на смежных территориях были выявлены антитела, а затем и вирус 6-го серотипа. При заражении им чувствительных животных были отмечены слабые клинические признаки блютанга [17, 18].

Позже в Бельгии вирус 6-го серотипа был выявлен у телят, завезенных из Нидерландов. Вирус оказался гомологичным южно-африканскому референтному штамму, используемому в живой вакцине.

О подобной ситуации, но уже с циркуляцией вируса блютанга 11-го серотипа, Бельгия [19] сообщала в ноябре 2008 г., когда в ходе эпизоотии блютанга 8-го серотипа от коровы с павшим вскоре после отела теленком, а затем и на 8 фермах из 208 на севере страны у 12 животных из 7294 выявляли антитела и в ПЦР — геном вируса 11-го серотипа, в высокой степени сходного

Рис. 4. Район выявления серопозитивных на блютанг животных в Эстонии



Рис. 5. Район выявления блютанга 14-го серотипа в Польше (Podlaskie regione)



Таблица
Регионы распространения вируса блютанга разных серотипов в мире

География региона	Серотипы																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Африка	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Средний Восток	-	I	-	I	-	I	-	-	S	I	-	S	S	S	I	I	S	-	S	S	-	-	-	I	-	I	
Пакистан + Индия	I	I	I	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I	I	-	S	S	-	I	-	-	-	
Австралия	I	I	I	-	-	-	I	-	I	-	-	S	-	-	I	I	-	-	-	I	I	-	I	-	-	-	
Юго-Восточная Азия и Индонезия	I	I	I	I	-	-	I	-	I	I	S	I	S	-	-	I	I	S	S	S	I	-	I	-	-	-	
Китай	I	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	I	I	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	
США	I	I	I	-	I	I	-	-	-	I	I	-	I	I	-	-	I	-	I	-	-	I	-	I	-	-	
Центральная и Южная Америка	I	-	I	I	-	I	-	I	-	-	I	I	I	I	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Европа*	I	I	I	I	-	I	-	I	I	I	R	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	

с вирусом, используемым в южно-африканской живой вакцине против блютанга.

Выявление случаев циркуляции вакциноподобного вируса блютанга среди невакцинированных животных наряду с возможной реверсией аттенуированных штаммов или реабсорбцией их с эпизоотическими «дикими» вирусами блютанга явилось причиной принятия специальной Директивы ЕС от 14 марта 2012 г. № 2012/5/ЕС, существенно ограничивающей применение модифицированных живых вакцин против блютанга в Европе [14].

Эти положения закреплены в «Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» МЭБ в редакции 2014 г. (раздел С, пункт 2.3.2), признающем подтвержденную обоснованность опасений, что в полевых условиях возможна передача вакцинного вируса насекомым-переносчикам с последующим распространением вируса в популяции вектора и инфицированием интактных жвачных животных [13].

Что касается конкретного вируса серотипа 14, который получил распространение в ряде стран Европы в 2011–2012 гг., то представители референтных лабораторий по блютангу (Пербрайт, Великобритания; Испания; ВНИИВВиМ, Россия) считают, что выделенные штаммы являются реассортантами, содержащими геномные сегменты различных референтных вакцинных штаммов, происходящих из Южной Африки [23].

Но в то же время специалисты ВНИИВВиМ расценивают выявление в 2011–2012 гг. циркуляции вируса 14-го серотипа среди животных Калужской, Смоленской областей и соседних с ними регионов как свидетельство **стационарного неблагополучия местности** по блютангу [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По нашему мнению, факт выявления специфических антител при проведении мониторинговых исследований на блютанг отнюдь не является доказательством заболевания животных блютангом. Необходимо дополнительное эпизоотологическое расследование на

установление природы этих антител, хотя зачастую при массовых обследованиях ограничиваются только первым этапом.

Торгово-импортные операции по завозу в страну жвачных племенных и пользовательных животных необходимо осуществлять при строгом соблюдении «Кодекса здоровья наземных животных» (МЭБ) [26], требующего представление международного ветеринарного сертификата, подтверждающего выполнение всех условий по недопущению заноса блютанга.

В то же время считаем, что при импорте в РФ необходимо официально запретить приобретение за рубежом племенных, пользовательных, зоопарковых, цирковых жвачных животных, привитых живыми аттенуированными вакцинами против любых серотипов блютанга. Указанная мера будет препятствовать заносу и последующей циркуляции вакциноподобных штаммов, что значительно снижает эффективность диагностических исследований на блютанг.

Необходимо учитывать также и положения вышеупомянутого Руководства МЭБ [25], что аттенуированные вакцинные штаммы могут быть выявлены в семени вакцинированных быков и баранов, причем, если даже вирус и не обнаруживается, вакцинация живой вакциной снижает качество спермы продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ риска заноса блютанга (катаральной лихорадки овец) со скотом, импортируемым в Россию из стран Западной Европы / А.К. Караулов, В.М. Гуленкин, М.А. Титов [и др.] // Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». — 2008. — Сент. — С. 33–35.
2. Блютанг в начале 21 века: реальная эпизоотология / В.В. Макаров, Джоханнес Шоопала, С.И. Джупина, О.И. Сухарев // Ветеринария сегодня. — 2013. — № 1. — С. 8–10.
3. Захаров В.М. Блютанг овец и крупного рогатого скота — угроза распространения в Центрально-Азиатском регионе // Основные направления совершенствования ветеринарных услуг в эпоху могущества

и счастья: матер. Междунар. науч. конф. — Ашхабад, 2013. — С. 177–179.

4. Захаров В.М. Комплексность мер по предотвращению заноса и распространения блютанга в Российской Федерации // Ветеринария. — 2009. — № 5. — С. 3–5.

5. Колбасов Д.В. Трансмиссивные заболевания животных // Животноводство России. — 2013. — № 10. — С. 41–42.

6. Макаров В.В., Мищенко В.А., Сухарев О.И. Трансмиссивные экзотические инфекции животных на неэндемичных территориях. Часть 2. Блютанг и блютангоподобные болезни // Ветеринария сегодня. — 2012. — № 3. — С. 10–15.

7. Макаров В.В., Сухарев О.И., Василевич Ф.И. Блютанг 8 серотипа в Европе. Биология и эпидемиология вектора // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 16–21.

8. Макаров В.В., Сухарев О.И., Василевич Ф.И. Блютанг 8 серотипа в Европе: отношения «вирус↔Culicoides» // Ветеринария. — 2014. — № 6. — С. 18–23.

9. Макаров В.В., Сухарев О.И., Стрижаков А.А. Блютанг 8 серотипа в Европе. 1. Эпизоотический и клинический паттерн // Ветеринария сегодня. — 2014. — № 1. — С. 5–8.

10. Распространение блютанга в Европе и его реальная угроза для животноводства России / В.М. Захаров, В.М. Гуленкин, А.К. Караулов, С.А. Дудников // Рос. вет. журнал. СХЖ. — 2007. — № 4. — С. 4–6.

11. Animal Disease Information System from Member States. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm (дата обращения: 22.09.14).

12. Bluetongue / OIE. Terrestrial Animal Health Code. — 23th ed. — Chapter 8.3. — Paris, 2014.

13. Bluetongue // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — Chapter 2.1.3. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf.

14. Bluetongue situation in Russia / A. Panferova [et al.]. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

15. Department for Environment, Food&Rural Affairs. Bluetongue Virus in Estonia, Latvia, Lithuania and Poland, 28, 30 November 2012. — URL: <http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/monitoring/poa>.

16. Detection of Bluetongue outbreak in Smolensk region of Russia in 2011 / A. Panferova, A. Koltsov, M.

Novikova [et al.] // 6th Annual Meeting EPIZONE «Viruses on the move». Abstracts. — Brighton, UK, 2012. — P. 23.

17. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/epidemiological_report_en.pdf.

18. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BT_germany_report.pdf.

19. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BTbelgium_report.pdf.

20. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_latvia%20.pdf.

21. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_spain.pdf.

22. EC. Animal Health and Welfare. Bluetongue serotype 14 vaccine-like strain circulation December, 2012. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

23. Molecular characterization of BTV-14 in North Europe / K. Nomikou, C. Batten, E. Morecroft [et al.] // IV International Conference on Bluetongue and related Orbiviruses, 5–7 November, Book of Abstracts. — Rome, 2014. — P. 55.

24. Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. Section: Animal Health and Animal Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations_en.htm#04122012.

25. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2012/5/EU of the European Parliament and of the Council of 14 March 2012 amending Council Directive 2000/75/EC as regards vaccination against bluetongue // Official Journal of the European Union. — 2012. — L. 81. — P. 1–2.

26. VBD Molecular Epidemiology Report Form (2012-02-03; 2012-11-22, 2012-11-30). — Reference Laboratory at The Pirbright Institute.

27. World Animal Health Information Database OIE. — 2014.

28. Zakharov V., Mishchenko V. Bluetongue prevention in Russia // 3rd Annual Meeting EPIZONE «Crossing borders». Programme and Abstracts. — Antalya, Turkey, 2009. — P. 114.

CASES OF DETECTION OF SEROTYPE 14 BLUETONGUE VACCINE-LIKE VIRUS IN THE RF AND EUROPEAN COUNTRIES IN 2011–2012

V.M. Zakharov¹, A.V. Kononov², V.A. Mischenko³

¹ Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zaharov@arriah.ru

² Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Leading Research Officer, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

Associated with isolation of vaccine-like attenuated bluetongue virus cases of 14 serotype bluetongue virus detection in European countries and the RF in 2011–2012 are analysed in the paper.

Key words: bluetongue, virus serotypes, live vaccines.

INTRODUCTION

A bluetongue problem continues to attract careful attention of veterinary specialists [1, 3, 4, 10, 28] due to the disease wide geographic spread in the world and, particularly, in Europe. Indeed, according to the data of the OIE and EU Animal Disease Notification System [11, 27] the occurrence of more than 2.6 thousand of serotype 1 and 4 bluetongue outbreaks was registered in European countries only at the end of September 2014 (Albania, Bulgaria, Bosnia and Herzegovina, Greece, Spain, Italy, Macedonia, Romania, Serbia and Turkey).

But in the first instance, the interest to the disease is associated with the unprecedented spread of bluetongue nosoarea from endemic regions of Africa and Asia northward when nosoarea border has shifted from usual 40° to 58° north latitude (Sweden, Norway). The introduction of bluetongue virus different serotypes into European countries was observed from October 1998 and in 2006 practically all countries of North-Western Europe were affected with serotype 8 virus. A peak of the disease manifestation intensity fell within 2007–2008 when more than 60 thousand outbreaks were detected. Widespread disease outbreaks were registered also in subsequent years, but as long ago as 2011 only 39 disease outbreaks were registered (Greece, Italy, Spain, Portugal, Cyprus).

The detailed epidemic analysis of the bluetongue situation for the given period was undertaken by V.V. Makarov

et al. in a series of special publications on the subject including those within the covers of the journal «Veterinaria segodnya» [2, 6, 7, 8, 9, 10].

The present paper is aimed at the analysis of data of international information systems of official OIE, FAO, EU sources on cases of serotype 14 bluetongue virus registration in European countries and the Russian Federation in 2011–2012 as, from our point of view, these materials have found no proper reflection in national scientific publications.

RESULTS AND DISCUSSION

The detection in Russia of serotype 14 bluetongue virus was reported for the first time by GNU «VNIIViM» (Pokrov) specialists carrying out bluetongue monitoring among imported into the country pedigree animals in the information presented at the annual conference EPIZONE in June 2012 as well as at the annual meeting of reference laboratories for bluetongue in Great Britain in December 2012 [14, 16].

The cattle consignment was imported on 29 August 2011 in OOO «Pedigree Centre Smolensky Gallovey» from Germany (Hagen). In the territory of Germany animals were tested on 8–20 August for bluetongue using ELISA and PCR with a negative result. Animals were transported via Poland and Belarus.



Fig. 1. Sites of detection of bluetongue-seropositive cattle and small cattle in the Smolensk and Kaluga Oblasts (VNIIViM)



Fig. 2. Lithuanian regions where bluetongue seropositive animals were found [22]

Upon arrival in the Smolensk Oblast on 29 August animals were detained in quarantine and on 2 September 2011 their samples were tested at the GNU «VNIIViM» using ELISA and PCR also with a negative result.

As a result of repeated serological testings dated 28 September 2011 five out of 71 cattle demonstrated specific antibodies to bluetongue virus and 4 cattle were positive by PCR. Subsequent serological testings of samples from positive animals showed a significant increase in antibody level during 4 months.

Bluetongue virus genome was detected in cow blood on 26 January 2012 but it was not identified in the course of typing with diagnostica of 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 and 16 serotypes.

Isolated RNA was sent to the F. Loeffler Institute (Germany) where serotype 14 bluetongue was diagnosed.

In January 2012 the virus was isolated in the VNIIViM using Vero culture and lambs and typed by neutralization test as serotype 14; the information was sent to the OIE on 14 March 2012.

In June 2012 pathological materials were also sent to the EU Reference Laboratory for Bluetongue (Pirbright, Great Britain) and on 22 November 2012 it was confirmed that the virus belonged to serotype 14 [26]. The designated as RUS2011/01 strain had 99.9% identity with vaccine strain BTV-14RSArrr/14 included as a compound of the commercial polyvalent attenuated vaccine of RSA origin (Onderstepoort Biological Products (OBP – South Africa)) from a primary bottle A containing bluetongue viruses of 1, 4, 6, 12 and 14 serotypes.

Subsequent to the results of screening investigations for bluetongue held by the VNIIViM in the Smolensk and Kaluga Oblasts in 2012 a great number of bluetongue-positive animals were found (Fig. 1).

Those findings enabled VNIIViM researchers to put forward an assumption at the Conference of Reference Laboratories for Bluetongue in December 2012 that serotype 14 bluetongue virus circulated in the western part of the Russian Federation at least during the last two years especially as no systemic investigations for bluetongue were held among local cattle [16].

The epidemiological monitoring of cattle farms in the Smolensk and Kaluga Oblasts carried out by FGBI «ARRIAH» researchers demonstrated no bluetongue clinical manifestation.

Repeatedly addressing the European Commission Directorate-General for Health and Consumers the Rosselkhoznadzor Management expressed a serious concern

due to detection in imported from Germany animals of serotype 14 bluetongue virus.

Practically at the same time the Baltic countries and Poland reported about the detection in their territories of serotype 14 bluetongue-positive animals.

The EU Commission for Animal Health and Welfare reported on its site [22] in December 2012 that Lithuania notified the EU Commission on 13 November 2012 about detection in its territory of serotype 14 bluetongue-positive cattle. Fifty one animals from 27 farms in different regions were tested. No animal demonstrated bluetongue clinical signs, all blood samples were negative by PCR but in 15 samples antibodies to bluetongue virus were detected. On 23–25 November 280 bovine blood samples were tested, at that 64 animals were seropositive but all samples were negative by PCR.

Lithuanian regions where bluetongue seropositive animals were found are shown in Fig. 2.

It is important to note that at the meeting of the EU Commission for Animal Health and Welfare on 4 December 2012 [21, 24] representatives of Spain reported that among imported from Lithuania cattle 9 animals were serotype 14 bluetongue-positive by PCR; data were confirmed by blood sample testings in Pirbright. Animals with a positive response were destroyed.

At the meeting of the EU Commission on 30 November 2012 Latvia informed that a significant number of bluetongue seropositive animals were found in the country starting September. Thus, out of 6,988 cattle 206 animals

Fig. 3. Geographical distribution of farms with bluetongue seropositive animals in Latvia [20]



were seropositive, 54 animals out of them were born in 2012. As a rule, 1-2 seropositive animals were found in herds, all animals were negative by PCR with respect to bluetongue, no clinical manifestation was observed as well. Blood from seropositive animals was sent to Pirbright where the fact of animal infection by serotype 14 bluetongue virus was confirmed.

The geographical distribution of farms with bluetongue seropositive animals in Latvia is shown in Fig. 3.

As is evident from Fig. 3, farms with bluetongue-seropositive animals are located practically in the whole territory of Latvia.

Estonia notified the EU Commission by a fax dated 22 November 2012 about detection of bluetongue-seropositive animals in the Saare region (Fig. 4) without any additional clarifications.

Poland [22] also reported suspected bluetongue among cattle to the EU in January 2012; it sent bovine blood samples to Pirbright. But no accurate results were obtained. At a later stage, as a result of monitoring investigations within the framework of the National Programme for Bluetongue Surveillance bluetongue virus genome was detected in the IIIrd quarter 2012 in animal blood from 3 farms in the region bordering Lithuania and Belarus (Fig. 5).

The Reference Laboratory in Pirbright [26] confirmed the infection of animals with serotype 14 bluetongue virus in Poland, Latvia and Lithuania. The virus had 100% identity with the reference vaccine strain BTV-14 South Africa included as a compound of the commercial polyvalent attenuated vaccine of Onderstepoort Biological Products origin (OBP – South Africa) and 99.9% identity with Russian strain RUS2011/01 isolated in the Smolensk Oblast.

Generally, the assessment of the situation on serotype 14 bluetongue virus in a number of countries including Russia and assumptions on a supposed source of infection are far from being conclusive.

According to the official data of the EU Reference Laboratory for Bluetongue (Pirbright) an epidemic virus of the aforementioned serotype circulates only in the USA, countries of Central and South America, Africa (table). The presence of antibodies to the virus of the given serotype was detected among animals in countries of Middle East, Pakistan, India.

As a matter of course a question was raised as to where from serotype 14 virus could occur in the territory of the Russian Federation. The simplest assumption was as follows: the virus was introduced with imported animals from Germany. But for all that, one cannot leave out of account the fact that imported in August 2011 animals were twice

tested for bluetongue in Germany with a negative result and later they were tested with the same negative result while being in quarantine in the Smolensk Oblast. And antibodies to bluetongue virus were detected only in repeated testings held on 28 September.

The understandable question now arises of whether animals were affected in the territory of the Smolensk Oblast after delivery from Germany?

The Department of Environment, Food and Rural Affairs of Great Britain [15] carries out predictive investigations due to spread of animal contagious diseases. The Department made an assumption that vaccine virus could be most probably introduced with vaccinated animals from the region where serotype 14 virus was circulating. The USA were mentioned as such animal exporting country where a live vaccine from a virus of the given serotype could be used. It was emphasized that EU countries including Poland and Baltic countries did not import live animals from the USA but such animals were imported in recent years in Russia.

It is also necessary to note that in no instance the clinical manifestation of the disease was observed either in Russia or Poland and Baltic countries in cases of finding serotype 14 bluetongue-seropositive or PCR-positive animals.

Cases of circulation of bluetongue vaccine-like viruses were registered earlier in the course of the epidemic. Indeed, antibodies and later serotype 6 virus were detected in cattle in neighboring territories of the Netherlands and Germany in October-November 2008 in the course of the bluetongue epidemic caused by serotype 8 virus. Affected susceptible animals demonstrated bluetongue mild clinical signs [17, 18].

Later in Belgium serotype 6 virus was detected in calves imported from the Netherlands. The virus was homologous to South –African reference strain used in a live vaccine.

Belgium [19] reported in November 2008 about the similar situation but with circulation of serotype 11 bluetongue virus when in the course of bluetongue serotype 8 epidemic antibodies were detected in a cow with a dead newborn calf and later in 12 out of 7,294 animals on 8 out of 208 farms and serotype 11 virus genome was detected by PCR and the virus was to a high degree similar to the virus used in the South-African live vaccine against bluetongue.

The detection of circulation of bluetongue vaccine-like virus in non-vaccinated animals along with the possible backward mutation of attenuated strains or their reassortment with epidemic «wild» bluetongue viruses was a

reason for approval of a special EU Directive No. 2012/5/EU of 14 March 2012 significantly restricting the use of «modified live vaccines» against bluetongue in Europe [14].

These provisions are consolidated in the OIE «Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals» as amended in 2014 (Chapter C, point 2.3.2) recognizing the confirmed justification of concerns associated with a possibility of vaccine virus transmission by insect carriers with subsequent spread of virus in vector population and infection of intact ruminants [13].

As for the given serotype 14 virus spread in a number of European countries in 2011–2012, representatives of reference laboratories for bluetongue (Pirbright, Great Britain; Spain; VNIIVViM, Russia) are of the opinion that isolated strains are reassortants containing genome segments of different vaccine strains of South Africa origin [23].

At the same time VNIIVViM researchers consider the detection in 2011–2012 of 14 serotype virus circulation among animals in the Kaluga, Smolensk Oblasts and neighboring regions as an evidence of bluetongue **stationary affected areas** [5].

CONCLUSION

We are of the opinion that the fact of specific antibody detection in the course of monitoring investigations for bluetongue is not an evidence of animal affection with bluetongue. It is necessary to carry out an additional epidemiological investigation in order to establish the origin of these antibodies, nevertheless, while carrying out mass screening investigations researchers confine themselves on frequent occasions only to the first stage.

Trade-import operations for import in the country of pedigree and commercial ruminants should be performed under strict observance of «Terrestrial Animal Health Code» (OIE) [12] requiring submission of an international veterinary certificate confirming the fulfillment of all conditions for prevention of bluetongue introduction.

At the same time we think that in cases of import in the RF it is necessary to prohibit officially the purchase in foreign countries of ruminants for zoos and circus, pedigree,

commercial ruminants, immunized with live attenuated vaccines against any bluetongue serotypes. The aforementioned measure will prevent the introduction and subsequent circulation of vaccine-like strains which will significantly decrease the efficacy of diagnostic investigations for bluetongue.

It is also necessary to take into consideration provisions of the aforementioned OIE Manual [13] that attenuated vaccine strains can be detected in semen from vaccinated bulls and rams and, moreover, if virus is not detected the vaccination with a live vaccine lowers semen quality.

BIBLIOGRAPHY

1. Analysis of a risk of bluetongue (ovine catarrhal fever) introduction with livestock imported in Russia from West European countries / A. K. Karaulov, V. M. Gulenkin, M. A. Titov [et al.] // Rus. Vet. Journ. Selkhoz. zhivotnye. Special issue devoted to 50-th anniversary of FGI «ARRIAH». — 2008. — Sept. — P. 33–35.
2. Bluetongue at the beginning of the 21st century: real epidemiology / V. V. Makarov, Johannes Shoopala, S. I. Dzhupina, O. I. Sukharev // Veterinariya Segodnya. — 2013. — № 1. — P. 8–10.
3. Zakharov V. M. Bluetongue in sheep and cattle — a threat of spread in the Central Asian region // Major trends of improvement of veterinary services in the epoch of power and happiness: proceed. of Internat. scient. conf. — Ashkhabad, 2013. — P. 177–179.
4. Zakharov V. M. Comprehensiveness of measures aimed at prevention of bluetongue introduction and spread in the Russian Federation // Veterinariya. — 2009. — № 5. — P. 3–5.
5. Kolbasov D. V. Animal transmissible diseases // Zhitovnovodstvo Rossii. — 2013. — № 10. — P. 41–42.
6. Makarov V. V., Mischenko V. A., Sukharev O. I. Animal transmissible foreign infections in non-endemic territories. Part 2. Bluetongue and bluetongue-like diseases // Veterinariya Segodnya. — 2012. — № 3. — P. 10–15.
7. Makarov V. V., Sukharev O. I., Vasilevich F. I. Serotype 8 bluetongue in Europe. Vector biology and epidemiology // Veterinariya. — 2014. — № 9. — P. 16–21.

Fig. 4. Area of detection of bluetongue-seropositive animals in Estonia



Fig. 5. Area of serotype 14 bluetongue detection in Poland (Podlaskie regione)



Table

Region geography	Serotype																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Africa	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Middle East	-	I	-	I	-	I	-	-	S	I	-	S	S	S	I	I	S	-	S	S	-	-	-	I	-	I
Pakistan + India	I	I	I	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	-	S	S	-	I	-	-
Australia	I	I	I	-	-	-	I	-	I	-	-	S	-	-	I	I	-	-	-	I	I	-	I	-	-	-
South-East Asia and Indonesia	I	I	I	I	-	-	I	-	I	I	S	I	S	-	-	I	I	S	S	S	I	-	I	-	-	-
China	I	I	I	I	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	I	I	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-
USA	I	I	I	-	I	I	-	-	-	I	I	-	I	I	-	-	I	-	I	-	-	-	-	I	-	-
Central and South America	I	-	I	I	-	I	-	I	-	-	I	I	I	I	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Europe*	I	I	I	I	-	I	-	I	I	I	R	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R

8. Makarov V. V., Sukharev O. I., Vasilevich F. I. Serotype 8 bluetongue in Europe: relationships «virus↔*Culicoides*» // Veterinarya. — 2014. — № 6. — P. 18–23.

9. Makarov V. V., Sukharev O. I., Vasilevich F. I. Serotype 8 bluetongue in Europe. 1. Epidemiological and clinical pattern // Veterinariya Segodnya. — 2014. — № 1. — P. 5–8.

10. Spread of bluetongue in Europe and its real threat for animal husbandry in Russia / V. M. Zakharov, V. M. Gulenkin, A. K. Karaulov, S. A. Dudnikov // Rus. Vet. Journ. Selkhoz. zhivotnye. — 2007. — № 4. — P. 4–6.

11. Animal Disease Information System from Member States. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm (date of inquiry: 22.09.14).

12. Bluetongue / OIE. Terrestrial Animal Health Code. — 23th ed. — Chapter 8.3. — Paris, 2014.

13. Bluetongue // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — Chapter 2.1.3. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUE-TONGUE.pdf.

14. Bluetongue situation in Russia / A. Panferova [et al.]. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

15. Department for Environment, Food & Rural Affairs. Bluetongue Virus in Estonia, Latvia, Lithuania and Poland, 28, 30 November 2012. — URL: <http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/monitoring/poa>.

16. Detection of Bluetongue outbreak in Smolensk region of Russia in 2011 / A. Panferova, A. Koltsov, M. Novikova [et al.] // 6th Annual Meeting EPIZONE «Viruses on the move». Abstracts. — Brighton, UK, 2012. — P. 23.

17. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/epidemiological_report_en.pdf.

18. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BT_germany_report.pdf.

19. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BTbelgium_report.pdf.

20. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_latvia%20.pdf.

21. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_spain.pdf.

22. EC. Animal Health and Welfare. Bluetongue serotype 14 vaccine-like strain circulation December, 2012. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

23. Molecular characterization of BT-14 in North Europe / K. Nomikou, C. Batten, E. Morekroft [et al.] // IV International Conference on Bluetongue and related Orbiviruses, 5–7 November, Book of Abstracts. — Rome, 2014. — P. 55.

24. Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. Section: Animal Health and Animal Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations_en.htm#04122012.

25. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2012/5/EU of the European Parliament and of the Council of 14 March 2012 amending Council Directive 2000/75/EC as regards vaccination against bluetongue // Official Journal of the European Union. — 2012. — L. 81. — P. 1–2.

26. VBD Molecular Epidemiology Report Form (2012-02-03; 2012-11-22, 2012-11-30). — Reference Laboratory at the Pirbright Institute.

27. World Animal Health Information Database OIE. — 2014.

28. Zakharov V., Mischenko V. Bluetongue prevention in Russia // 3rd Annual Meeting EPIZONE «Crossing borders». Programme and Abstracts. — Antalya, Turkey, 2009. — P. 114.

УДК 619:616.98:578.821.21:636.52/.58:615.371:616-085.37

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА «ЗАМЕДЛЕННОЙ РЕАКЦИИ СЕРЕЖЕК» У КУР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУНИТЕТА К ОСПЕ ПТИЦ

С.А. Похвальный¹, В.Ю. Кулаков², А.С. Самсонова³

¹ кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pohvalny@arriah.ru

² кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Применили тест «замедленной реакции сережек» у цыплят, вакцинированных против оспы птиц. Определили модель связи величины относительного коэффициента воспаления и прививной дозы аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур и произвели сравнение результатов теста «замедленной реакции сережек» с напряженностью иммунитета.

Ключевые слова: тест «замедленной реакции сережек», аттенуированный штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур, напряженность иммунитета, метод «повторной прививки», клеточно-опосредованный иммунитет, гиперчувствительность замедленного типа.

UDC 619:616.98:578.821.21:636.52/.58:615.371:616-085.37

APPLICATION OF «DELAYED WATTLE REACTION» ASSAY IN CHICKEN FOR RAPID ASSESSMENT OF ANTI FOWL POX IMMUNITY LEVEL

S.A. Pokhvalny¹, V.Yu. Kulakov², A.S. Samsonova³

¹ Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pohvalny@arriah.ru

² Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

«Delayed wattle reaction» assay was applied in chicken vaccinated against fowl pox. Pattern of correlation between inflammation relative coefficient and inoculation dose of attenuated strain «KEM-7» of fowl pox virus was determined and results of «delayed wattle reaction» assay were compared with the level of immunity.

Key words: «delayed wattle reaction» assay, attenuated strain «KEM-7» of fowl pox virus, level of immunity, «re-inoculation» method, cell-mediated immunity, delayed hypersensitivity.

Сокращения и обозначения: ХАО — хориоаллантоисная оболочка; SPF — животные, в организме которых исключено присутствие определенных патогенных микроорганизмов и специфических антител к ним; IgD — прививная доза вируса; $\pm m$ — величина стандартной ошибки измерения среднего значения; p — величина ошибки прогноза; n — число произведенных измерений.

ВВЕДЕНИЕ

Напряженность иммунитета к оспе у кур может быть определена либо контрольным заражением патогенным штаммом, либо методом «повторной прививки» вакцинного штамма [5, 7]. Оба способа оценки являются эффективными, однако их продолжительность составляет 14 суток.

Иммунная реакция организма птицы на вирус оспы имеет две составляющие: гуморальную и клеточно-опосредованную. Первая может быть обнаружена в различных серологических реакциях, вторая — в тестах, где оценивается активность иммунокомпетентных клеток [4, 5, 6, 7]. При этом считается, что гуморальный иммунный ответ птиц при оспе играет второстепенную роль и имеет слабую связь с напряженностью иммунитета [5, 6, 7]. Наряду с этим известны результаты исследований, подтверждающие развитие клеточно-опосредованного иммунитета у вакцинированных птиц против оспы [4, 7].

Для демонстрации *in vivo* клеточно-опосредованного иммунитета к оспе у цыплят описан тест «замедленной реакции сережек», проявляющейся в ответ на инъекцию разведенной вакцины непосредственно в сережку [4]. Оценочным показателем данного теста является изменение толщины сережки вследствие альтернативного воспаления (без образования экссудата). При этом введение в противоположную сережку

неинфекционного материала (в качестве отрицательного контроля) позволяет сопоставить интенсивность специфического и неспецифического воспалительных процессов.

В настоящем сообщении представлены результаты использования теста «замедленной реакции сережек» на иммунизированных и интактных птицах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали аттенуированный штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур в составе суспензии гомогената ткани ХАО эмбрионов SPF-кур. Была предварительно определена инфекционная активность вируса в материале, которая составила $5,86 \text{ Ig ID}_{50}/\text{см}^3$.

Подопытная птица. Клинически здоровые цыплята яичного кросса *Hisexwhite* 70-суточного возраста, не иммунные к оспе птиц, в количестве 60 голов.

Процедура интрадермальной вакцинации. С помощью двухигольного инъектора проводили интрадермальную инъекцию путем смачивания игл в ресуспендированной вакцине и последующего сквозного прокалывания безоперенного участка кожи с внутренней стороны перепонки правого крыла. Объем интрадермальной инъекции вакцины составлял $0,004 \text{ см}^3$.

Тест «замедленной реакции сережек». Цыплятам в правую сережку вводили с помощью инсулинового шприца в объеме $0,1 \text{ см}^3$ вирусный материал, содержащий штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе $4 \text{ Ig ID}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. В левую сережку аналогичным способом производили инъекцию имитатора (гомогената суспензии ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур). Через 24–48 ч после инъекции проводили

Рис. 1. Измерение толщины сережек цыпленка с помощью штангенциркуля в тесте «замедленной реакции сережек»



измерение толщины сережек (расстояния между латеральной и медиальной поверхностями) штангенциркулем с точностью измерения $0,1 \text{ мм}$ (рис. 1).

Определение напряженности иммунитета методом «повторной прививки». Цыплятам производили интрадермальную инъекцию штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе $10^3 \text{ ID}_{50}/0,004 \text{ см}^3$ в перепонку левого крыла. На 5–7 сутки после инъекции проводили осмотр птиц, учитывали наличие поствакцинальной реакции в области инъекции штамма в виде ограниченного воспалительного процесса. Птиц считали защищенными, если воспалительная реакция отсутствовала. Определяли долю защищенных птиц в каждой группе.

Статистическая обработка. Использовали общепринятые методы вычисления дисперсий, стандартных ошибок и существенности различий средних эмпирических оценок выборок варьирующих переменных. В тексте статистические вариации средних значений (x) представлены в виде стандартных ошибок ($x \pm m$), установленных по результатам не менее 3 единичных измерений. Устанавливали количественные показатели связи зависимых переменных в виде коэффициентов корреляции (r) и путем построения регрессионной модели ($y = y_0 + kx$, где: y — прогнозируемое значение зависимого параметра для заданного x), а также вычисляли коэффициенты детерминации (R^2), оценивающие адекватность модели [1]. Для вычислительных операций и построения диаграммы использовали программу Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цыплят разделили на 6 равных групп по 10 голов в каждой. Затем цыплятам 1, 2, 3, 4 и 5 групп была произведена интрадермальная инъекция штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе 10^3 , 10^2 , 10 , 1 и $0,1 \text{ ID}_{50}/0,004 \text{ см}^3$ соответственно. Группа 6 была принята в качестве контрольной, цыплятам которой был инъецирован внутрикожно имитатор в виде суспензии гомогената ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур. За цыплятами вели ежедневно клиническое наблюдение.

На 21-е сутки после начала опыта во всех подопытных и контрольной группах был проведен одновременно тест «замедленной реакции сережек» и оценка напряженности иммунитета методом «повторной прививки». Через 24–48 ч после инъекции вирусного и неинфекционного материалов в сережки произвели измерения их толщины. Оценкой теста «замедленной реакции сережек» считали относительный коэффициент воспаления (K), который вычисляли по формуле:

$$K = (R - L) / L,$$

где R — толщина (расстояние от латеральной до медиальной стороны) правой сережки (куда был инъецирован вирусный материал), мм;

L — толщина левой сережки (инъецирован имитатор), мм.

Принятый коэффициент имеет свойство односторонности, т.е. большее значение соответствует более интенсивной степени специфической реакции. При этом считали, что результирующей оценкой для данной группы птиц (опытных и контрольной) будет среднее значение коэффициента, рассчитанное по вы-

Таблица
Результаты теста «замедленной реакции сережек» и оценки напряженности иммунитета к оспе птиц

№ гр.	Доза вируса, ID_{50}^*	Относительный коэффициент воспаления ($K \pm m$)**	Напряженность иммунитета против оспы птиц ($C_{\text{прот}}$)
1	1000	$1,53 \pm 0,17$	100%***
2	100	$0,66 \pm 0,16$	100%
3	10	$0,42 \pm 0,12$	90%
4	1	$0,38 \pm 0,16$	50%
5	0,1	$0,13 \pm 0,07$	0%
6	контроль	$0,12 \pm 0,04$	0%

*доза штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур, привитая внутрикожно с помощью двухигольного инъектора в перепонку правого крыла;

**даны средние величины измерений и их стандартные ошибки ($x \pm m$; $n = 10$);

***процент иммунных птиц в группе по результатам реакции на повторную прививку.

борке единичных измерений. Объем выборки должен быть достаточен для проведения необходимых статистических операций.

Рассчитанные значения относительного коэффициента воспаления (K) и результаты оценки напряженности иммунитета против оспы птиц методом «повторной прививки» у цыплят опытных и контрольной групп представлены в таблице.

Из данных таблицы следует, что установленные соответственно испытанным прививным дозам вируса (D) средние оценки K демонстрируют собственную значимость ($t = K/m$), т.е. статистическое отличие от нуля, при соблюдении условия $p \leq 0,05$ (по Стьюденту) в границах $10^3 \leq D \leq 10$. Меньшие дозы не обусловили статистически значимых коэффициентов. При этом формально их величины превышали соответствующую среднюю оценку в группе контроля. Очевидно, что установленная недоверительность отмеченных показателей явилась следствием малочисленности последних двух опытных групп.

Средний коэффициент воспаления в группе контроля, описывающий реакцию на инъекцию вируса неиммунным птицам, был достоверно меньше, чем соответствующие величины, установленные в трех первых опытных группах, но при этом являлся статистически значимым ($t = (0,12/0,04) > t_{p=0,02} = 2,718$). Это обстоятельство позволило принять верхнюю границу доверительного интервала ($p \leq 0,05$) данной величины в качестве порогового показателя неспецифической реакции птицы ($K = 0,12 + (0,04 \times 2,201) \approx 0,21$).

По результатам, полученным в пяти опытных группах птиц, сделали заключение, что между соответствующими средними значениями K и показателями $C_{\text{прот}}$ присутствовала явная положительная связь. При этом гарантированный уровень защищенности соответствовал коэффициентам, которые превышали величину $K \pm m = 0,42 \pm 0,12$.

Далее исследовали связь между величиной коэффициента воспаления сережек и дозой вируса, которой были привиты цыплята. Результаты анализа зависимости коэффициентов K от IgD представлены в виде диаграммы на рис. 2.

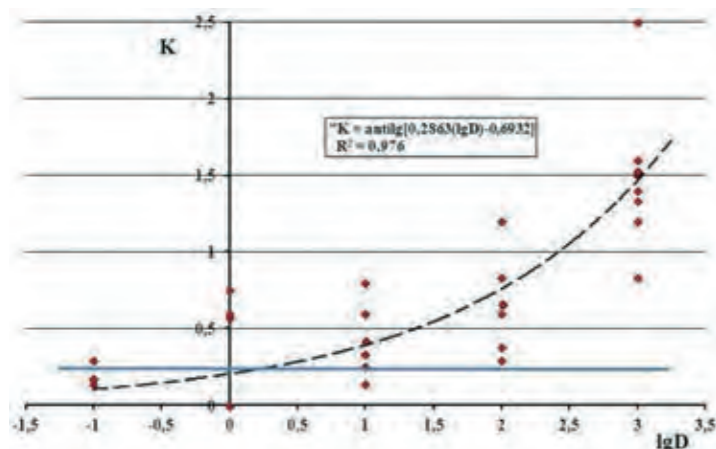


Рис. 2. Зависимость коэффициента воспаления сереежек (K) у цыплят от величины прививной дозы (lgD) штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур

Дано распределение экспериментальных значений относительного коэффициента воспаления сереежек (K) соответственно испытанным прививным дозам вируса (lgD).

Пунктиром показан график зависимости величины относительного коэффициента воспаления сереежек у кур от прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур, построенный по регрессионному уравнению: $K = \text{antilg}[0,2863(\text{lgD}) - 0,6932]$, где K — прогнозируемый относительный коэффициент воспаления сереежек для заданной величины прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур (lgD).

Линия синего цвета, параллельная оси абсцисс, соответствует пороговому значению отрицательного контроля, которое составляет 0,21.

Диаграмма иллюстрирует монотонное возрастание значения коэффициента воспаления соответственно испытанным дозам. Коэффициент корреляции величин K и lgD составил величину $R = 0,987$, и соответствующая модель связи (регрессионная модель) имела вид $K = \text{antilg}[0,2863(\text{lgD}) - 0,6932]$, где K — прогнозируемое значение коэффициента воспаления для заданной дозы вируса (lgD). Приведенная модель имела коэффициент адекватности $R^2 = 0,976$, что позволяло использовать ее для целей обратного прогноза. А именно, уравнение вида: $\text{lg}^*D = (0,6932 - \text{lg}K) / 0,2863$ по результатам оценки среднего коэффициента воспаления сереежек (K) позволяет определить ожидаемую величину прививной дозы вируса (lgD) и прогнозировать степень защищенности птицы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недостатком ранее опубликованной работы [4] можно считать то, что результаты теста «замедленной реакции сереежек» были соотнесены с результатами РТМЛ, которые между собой имели слабую связь, а не с непосредственно установленной напряженностью иммунитета в группе птиц.

При объяснении явления замедленной реакции сереежек необходимо исходить из следующего определения иммунитета — как направленной на поддержание гомеостаза способности организма распознавать, специфически реагировать и элиминировать генетически чужеродные вещества эндо- и гетерогенного происхождения. При повторном введении вируса оспы у привитых цыплят «включается» вторичный иммунный ответ.

Можно предположить, что тест «замедленной реакции сереежек» является проявлением реакции типа IV — группы патологических иммунных реакций, опосредованных клетками (или гиперчувствительности замедленного типа). Реакции этого типа обусловлены взаимодействием антигена с презентированными лимфоцитами, что приводит к повреждению тканей в результате неадекватного функционирования механизмов клеточного иммунитета, проявляемого в виде альтернативного воспаления [3].

Интрадермальная инъекция аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе больше $10 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^2$ обеспечивает индукцию иммунитета у привитых цыплят, выявляемую в тесте «замедленной реакции сереежек», что согласуется с предыдущими данными (для штамма «КЭМ-7» регламентированная прививная доза в составе эмбрион-вакцины против оспы птиц составляет не менее $100 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^2$) [2].

Таким образом, результаты описанного исследования являются доказательством пригодности теста «замедленной реакции сереежек» для экспресс-оценки напряженности иммунитета против оспы птиц в течение 24–48 ч. Для этого цыплят опытной группы (не менее 10 голов) можно будет считать защищенными от заражения вирусом оспы птиц, если на 24–48 ч после введения вирусной суспензии и суспензии гомогената ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур в равном объеме ($0,1 \text{ см}^3$) среднее значение разности толщины правой и левой сереежек будет статистически отличаться ($p \leq 0,05$) от аналогичного показателя у неиммунных птиц контрольной группы.

ВЫВОДЫ

1. Тест «замедленной реакции сереежек» обеспечивает быструю оценку напряженности иммунитета против оспы у вакцинированных цыплят в течение 24–48 ч.
2. Показана зависимость между долей защищенных птиц в группе против оспы птиц и проявлением местной реакции на введение вирусосодержащего материала в сереежки цыплятам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во МГУ, 1970. — 367 с.
2. Похвальный С.А., Кулаков В.Ю. Иммунобиологические свойства аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур // Ветеринария и кормление. — 2011. — № 6. — С. 43–45.
3. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ. / под ред. Р.Г. Василовой, А.Ф. Киркина. — М.: Мир, 1991. — 328 с.
4. Dharsana R., Spradbrow P.B. The demonstration of cell-mediated immunity in chickens vaccinated with fowlpox virus // Zbl. Vet. Med. R. B. — 1985. — Bd. 32, № 8. — P. 628–632.
5. Fowl pox // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 7th ed. — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.3.10. — P. 507–513.
6. Morita C. Role of humoral and cell-mediated immunity on the recovery of chickens from fowlpox virus infection // J. Immunol. — 1973. — Vol. 111, № 5. — P. 1495–1501.
7. Tripathy D.N., Hanson L.E. Immunity to fowlpox // Am. J. Vet. Res. — 1975. — Vol. 36, № 4. — P. 541–544.

УДК 619:615:543.54

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРИ АНАЛИЗЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Д.С. Большаков¹, В.Г. Амелин², Т.Б. Никешина³

¹научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

²ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В работе оценена возможность контроля качества готовых лекарственных средств методами капиллярного электрофореза. Выбраны оптимальные условия разделения и определения различных классов антибактериальных веществ: пенициллинов, фторхинолонов, нитрофуранов, сульфаниламидов, метронидазола и хлорамфеникола. Диапазон определяемых содержаний действующих компонентов составил 1–2500 мг/г для твердых образцов и 0,001–0,50% для жидких препаратов.

Ключевые слова: готовые лекарственные средства, капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, антибиотики, антибактериальные вещества.

UDC 619:615:543.54

CAPABILITIES OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF READY-TO-USE PHARMACEUTICAL PRODUCTS WITH AN ANTIBACTERIAL EFFECT

D.S. Bolshakov¹, V.G. Amelin², T.B. Nikeshina³

¹Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

²Leading Researcher, Doctor of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The capability to monitor quality of ready-to-use pharmaceuticals using capillary electrophoresis methods is evaluated in the paper. Optimal conditions for separation and determination of different classes of such antibacterial agents as penicillins, fluoroquinolones, nitrofurans, sulfanilamides, metronidazole and chloramphenicol are chosen. The range of content of active constituents is 1–2500 mg/g for solid samples and 0,001–0,50% for liquid preparations.

Key words: ready-to-use pharmaceuticals, capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, antibiotics, antibacterial agents..

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень развития химико-фармацевтической промышленности предъявляет серьезные требования к качеству производимой продукции: это касается как терапевтического эффекта готовых лекарственных средств (ГЛС), так и их подлинности. В отличие от первой проблемы, проблему аналитического контроля можно решить с использованием современных химических и физико-химических методов анализа.

Большую группу ГЛС составляют антибиотики и антибактериальные препараты. По данным ВОЗ, наибольшее количество подделок ГЛС (около 42%) приходится именно на антибиотики. Актуальной задачей фармакологического анализа антибиотиков является обеспечение его надежной аналитической базой. Традиционно для идентификации и количественного определения действующего начала антибактериальных препаратов применяют спектроскопические методы [2–4, 6, 14] и методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными вариантами детектирования [7, 8, 11–13, 15, 17]. Зачастую эти методы трудоемки или труднодоступны в силу высокой стоимости применяемого оборудования. Более доступным и экспрессным методом анализа ГЛС является метод капиллярного электрофореза (КЭ), который по селективности разделения и экологичности превосходит многие аналитические методы (в том числе и ВЭЖХ).

Цель данной работы заключалась в оценке возможности применения метода КЭ для анализа ГЛС антибактериального действия на основе пенициллинов (ПЦ), фторхинолонов (ФХ), нитрофуранов (НФ), сульфаниламидов (СА), метронидазола и хлорамфеникола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аппаратура. Использовали систему капиллярно-электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), оснащенную спектрофотометрическим детектором, немодифицированным кварцевым капилляром внутреннего диаметром 75 и 50 мкм, эффективной длиной 50 и 60 см, соответственно. Регистрацию и обработку данных проводили с программным обеспечением «Мультитром» и «Эльфран» (АО «Амперсэнд», Россия). В процессе подготовки проб использовали ультрацентрифугу Mini Spin (Eppendorf, Германия) и лабораторную центрифугу ОПН-3М («ПОЛИКОМ», Россия).

Растворители и реагенты. В работе использовали стандартные образцы следующих антибиотиков (Fluka Analytical, Sigma Aldrich, Dr. Ehrenstorfer): амоксициллина тригидрата, ампициллина тригидрата, данофлоксацина мезилата, диклоксациллина натриевой соли гидрата, клоксациллина натриевой соли моногидрата, левофлоксацина, ломефлоксацина гидрохлорида, метронидазола, нитрофуразона, оксациллина натриевой соли гидрата, пенициллина G натриевой соли, пемфоксацина метансульфоната моногидрата, сульфадиазина, сульфадиметоксина, сульфамеразина, сульфаклорпиридина, фуразолидона, фуралтадона, хлорамфеникола, ципрофлоксацина, эноксацина и энрофлоксацина.

Стандартные растворы антибиотиков (1 мг/мл) готовили растворением точных навесок каждого компонента в дистиллированной воде, 0,1 М HCl или ацетонитриле (в зависимости от природы вещества) и хранили при температуре 4°C. Рабочие растворы готовили в день использования разбавлением исходных дистиллированной водой.

Для приготовления ведущего электролита применяли додецилсульфат натрия (ДДС) (Merck), ацетонитрил (Prolabo), 10-водный тетраборат натрия (Sigma-Aldrich),

12-водный фосфат натрия двузамещенный (Prolabo), 2-водный фосфат натрия однозамещенный (Prolabo), фосфат тетрабутиламмония (ТБА) (Fluca Analytical), α -, γ -циклодекстрины (ЦД) (Sigma-Aldrich), бидистиллированную воду (ГОСТ 7602-72).

Лекарственные препараты. В работе исследовали лекарственные препараты, которые были обезличены и закодированы:

- образец № 1 (таблетки, действующее вещество ципрофлоксацин, 250 мг);
- образец № 2 (таблетки, действующее вещество ципрофлоксацин, 500 мг);
- образец № 3 (таблетки, действующее вещество сульфадиметоксин, 500 мг);
- образец № 4 (таблетки, действующее вещество нитрофуразол, 20 мг);
- образец № 5 (таблетки, действующее вещество хлорамфеникол, 250 мг);
- образец № 6 (капли глазные, действующее вещество хлорамфеникол, 0,25%);
- образец № 7 (капли глазные, действующее вещество хлорамфеникол, 0,25%);
- образец № 8 (таблетки, действующее вещество хлорамфеникол, 0,5 г);
- образец № 9 (таблетки, действующее вещество фуразолидон, 50 мг);
- образец № 10 (раствор для инъекций, действующее вещество энрофлоксацин, 5%);
- образец № 11 (таблетки, действующее вещество метронидазол, 250 мг);
- образец № 12 (таблетки, действующее вещество амоксициллин тригидрат, 500 мг);
- образец № 13 (таблетки, действующее вещество ампициллин тригидрат, 250 мг).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования были выбраны получившие широкое распространение ФХ (лемефлоксацин, данофлоксацин, эноксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, энрофлоксацин, пемфоксацин), СА (сульфадиметоксин, сульфамеразин, сульфадиазин, сульфаклорпиридин), НФ (фуразолидон, нитрофуразон, фуралтадон), ПЦ (амоксициллин, оксациллин, ампициллин, клоксациллин, пенициллин G, диклоксациллин), метронидазол (производное имидазола) и хлорамфеникол. Выбор данных антибактериальных препаратов обусловлен не только высокой эффективностью их действия, но и доступностью.

На выбор конкретного метода электрофоретического разделения влияет природа разделяемых компонентов. Самым простым вариантом КЭ является капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ). Компоненты сложной смеси движутся в среде электролита с разными скоростями, образуя дискретные зоны. Отличительная особенность КЗЭ состоит в том, что он пригоден для разделения только ионогенных компонентов пробы. В мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) — варианте КЭ, позволяющем проводить разделение соединений ионного и нейтрального характера, — использование поверхностно-активных веществ (ПАВ) приводит к формированию так называемой «псевдостационарной фазы», и аналиты распределяются между мицеллой и буферным электролитом. Применение органических растворителей, ион-парных и макроциклических реагентов зачастую способно значительно повысить селективность разделения смесей сложного состава.

Методика определения действующего вещества ГЛС антибактериального действия. Таблетки. Таблетку ГЛС (0,1–0,8 г) измельчали в ступке, отбирали 20–40 мг (точная навеска), растворяли в центрифужной пробирке в 10 мл подходящего растворителя (для ФХ использовали 0,1 М HCl; для СА, НФ, хлорамфеникола, метронидазола — ацетонитрил; для ПЦ — дистиллированную воду). Аликвоту 1 мл переносили в мерную колбу на 100 мл и растворяли в дистиллированной воде. **Растворы.** Жидкие лекарственные формы последовательно разбавляли дистиллированной водой до содержания определяемого вещества в интервале 0,5–20,0 мг/л. Полученный раствор центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и проводили электрофоретическое определение.

Выбор условий электрофоретического разделения. Поскольку анализируемые антибактериальные вещества в нейтральных и щелочных растворах образуют органические анионы (структурные формулы и константы кислотности приведены в табл. 1), для их разделения, идентификации и определения предпочтительно использовать метод КЗЭ. При выборе оптимального ведущего электролита для ФХ и СА исследовали возможность тетрабората натрия (рН 9,2) и фосфатного буферного раствора (рН 7,0–8,5). Большую селективность разделения смеси 11-ти антибиотиков обеспечивает применение 25 мМ фосфатного буферного раствора, но из-за его высокой электрической проводимости необходимо использовать капилляр с внутренним диаметром 50 мкм. При этом рН ведущего электролита как определяет селективность разделения пиков аналитов, так и оказывает влияние на площади и высоты

этих пиков. Поэтому оптимальным является ведущий электролит с рН 8,5, эффективность применения которого продемонстрирована на рис. 1.

Для смеси ПЦ КЗЭ-разделение является малоэффективным, поскольку часть антибиотиков имеет близкие значения pK_a (табл. 1). Применение МЭКХ привело к полному разделению смеси 6-ти ПЦ. Наличие в составе ведущего электролита α -ЦД не оказывает существенного влияния на электрофоретическое поведение аналитов. γ -ЦД, напротив, уменьшает селективность разделения пиков антибиотиков. Присутствие ацетонитрила и ТБА изменяет константы распределения ампициллина, амоксициллина и оксациллина между фазой раствора и мицеллярной фазой, что снижает эффективность их разделения. Оценено влияние концентрации мицеллообразователя на электрофоретическое поведение аналитов: увеличение содержания ДДС в ведущем электролите с 20 до 50 мМ приводит к уменьшению высоты пиков ПЦ. Высокую селективность разделения с сохранением необходимой чувствительности обеспечивает электролит, содержащий 30 мМ ДДС.

Сравнивая возможности тетрабората натрия и фосфатного буферного раствора (10 мМ), установлено, что применение последнего (рН 6,0–8,5) обеспечивает большую разрешающую способность пиков ПЦ, несколько уступая по эффективности разделения. На рис. 2 представлена зависимость эффективности разделения смеси 6-ти ПЦ от рН ведущего электролита: оптимальным является использование ведущего электролита, состоящего из 10 мМ фосфатного буферного раствора рН 7,0 и 30 мМ ДДС.

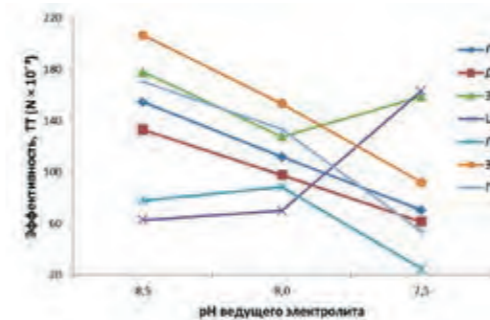


Рис. 1. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) ФХ от рН ведущего электролита (ЛМФ — лемефлоксацин, ДНФ — данофлоксацин, ЭНК — эноксацин, ЦПР — ципрофлоксацин, ЛВФ — левофлоксацин, ЭНР — энрофлоксацин, ПФЛ — пемфоксацин)

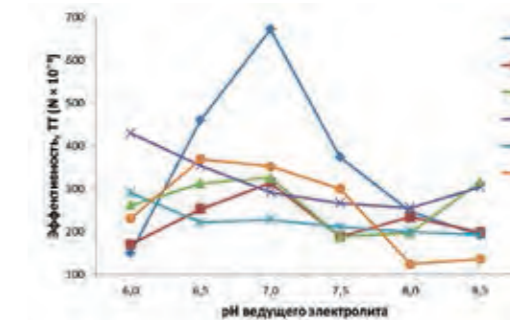


Рис. 2. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) ПЦ от рН ведущего электролита (концентрация ДДС 30 мМ) (АМО — амоксициллин, ОКС — оксациллин, АМП — ампициллин, КЛО — клоксациллин, ДКЛ — диклоксациллин, ПЕН — пенициллин G)

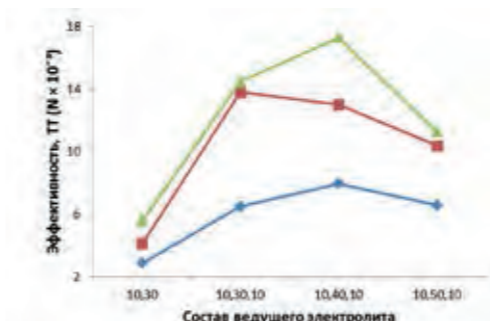


Рис. 3. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) НФ от состава ведущего электролита (мМ тетрабората натрия, мМ ДДС, об.% ацетонитрила) (ФЗД — фуразолидон, НФЗ — нитрофуразон, ФТД — фуралтадон)

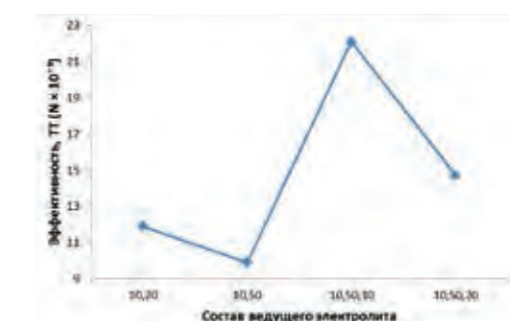


Рис. 4. Зависимость эффективности электромиграции (теоретические тарелки, ТТ) метронидазола от состава ведущего электролита (мМ тетрабората натрия, мМ ДДС, об.% ацетонитрила)

Таблица 1
Структурные формулы и константы кислотности анализируемых антибиотиков [12–18]

Ломефлоксацин гидрохлорид	Энрофлоксацин	Ципрофлоксацин	Эноксацин
 $pK_3(\text{COOH}) = 2,4$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,7$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,0$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$
Пефлоксацин	Данофлоксацин	Левифлоксацин	Сульфадиазин
 —*	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,1$	 —*	 $pK_3 = 6,5$
Сульфамеразин	Сульфадиметоксин	Сульфалорпиразидин	Фуразолидон
 $pK_3 = 7,0$	 $pK_3 = 6,2$	 $pK_3 = 5,5$	 $pK_3 = 4,9$
Нитрофуразон (нитрофураг)	Ампициллин	Оксациллина моногидрат	Клоксациллина натриевая соль
 $pK_3 = 10,0$	 $pK_3(\text{COOH}) = 2,6$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,3$	 $pK_3 = 2,7$	 $pK_3 = 2,7$
Фуралтадон	Амоксициллин	Пенициллина G натриевая соль	Диклоксациллина натриевая соль гидрат
 $pK_3 = 5,0$	 $pK_3(\text{COOH}) = 2,6$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,3$ $pK_3(\text{ArOH}) = 9,7$	 —*	 $pK_3 = 2,7$
	Хлорамфеникол	Метронидазол	
	 —*	 $pK_3 = 2,4$	

* нет данных.

При разделении НФ использование КЗЭ не может быть эффективным, поскольку фуразолидон и фуралтадон имеют близкие значения pK_3 , а нитрофуразон — очень слабая органическая кислота (табл. 1). Применение ведущего электролита, состоящего из 10 мМ тетрабората натрия и 30 мМ ДДС, обеспечивает полное разделение смеси 3-х НФ. Дополнительное введение в его состав ЦД в качестве участников конкурирующих реакций с аналитами не оказывает влияния на эффективность разделения. Однако наличие органического растворителя — ацетонитрила (5–20 об.%) существенно повышает чувствительность определения, достигая максимальных значений при концентрации 10 об.%, что, с другой стороны, отрицательно сказывается на селективности (рис. 3). Дальнейшее изучение электрофоретического поведения НФ при различных составах фонового буферного раствора показало, что подходящим является электролит, состоящий из 10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС и 10 об. % ацетонитрила (табл. 2).

Метронидазол, являясь сильной кислотой (табл. 1), должен быть определен методом КЗЭ при использовании положительного источника высокого напряжения и ведущего электролита с $pH > 7$. Однако этого не наблюдали. Его идентификация и количественное определение возможны в условиях МЭКХ при использовании ДДС и ацетонитрила в качестве мицеллообразователя и модификатора электроосмотического потока. На рис. 4 показано влияние состава ведущего электролита на эффективность миграции метронидазола. Оптимальным является применение ведущего

электролита, состоящего из 10 мМ тетрабората натрия, 50 мМ ДДС, 10 об. % ацетонитрила.

Проводить определение хлорамфеникола можно методами КЗЭ и МЭКХ. При использовании МЭКХ результаты отличаются лучшей воспроизводимостью в отличие от КЗЭ-определения. Для анализа ГЛС, содержащих хлорамфеникол, применяли электролит, содержащий 10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС и 10 об. % ацетонитрила.

Оптимальные условия идентификации и количественного определения антибиотиков различных классов в ГЛС и электрофореграммы стандартных растворов приведены в табл. 2 и рис. 5, соответственно. В табл. 3 представлены аналитические характеристики разработанных методик анализа ГЛС. Диапазон определяемых содержаний антибиотиков составляет 1–2500 мг/г для твердых образцов и 0,001–0,50% для жидких ГЛС.

Подобранные в работе условия электрофоретического разделения антибиотиков использовали для установления подлинности лекарственных препаратов и анализа соответствия заявленного количества действующего вещества.

Времена миграции идентифицируемых антибиотиков соответствуют используемым стандартным препаратам, что говорит о подлинности данных лекарственных средств. В табл. 4 приведены полученные результаты количественного анализа ГЛС, согласно которым содержание действующего вещества части лекарственных препаратов не соответствует заявленной на этикетке информации.

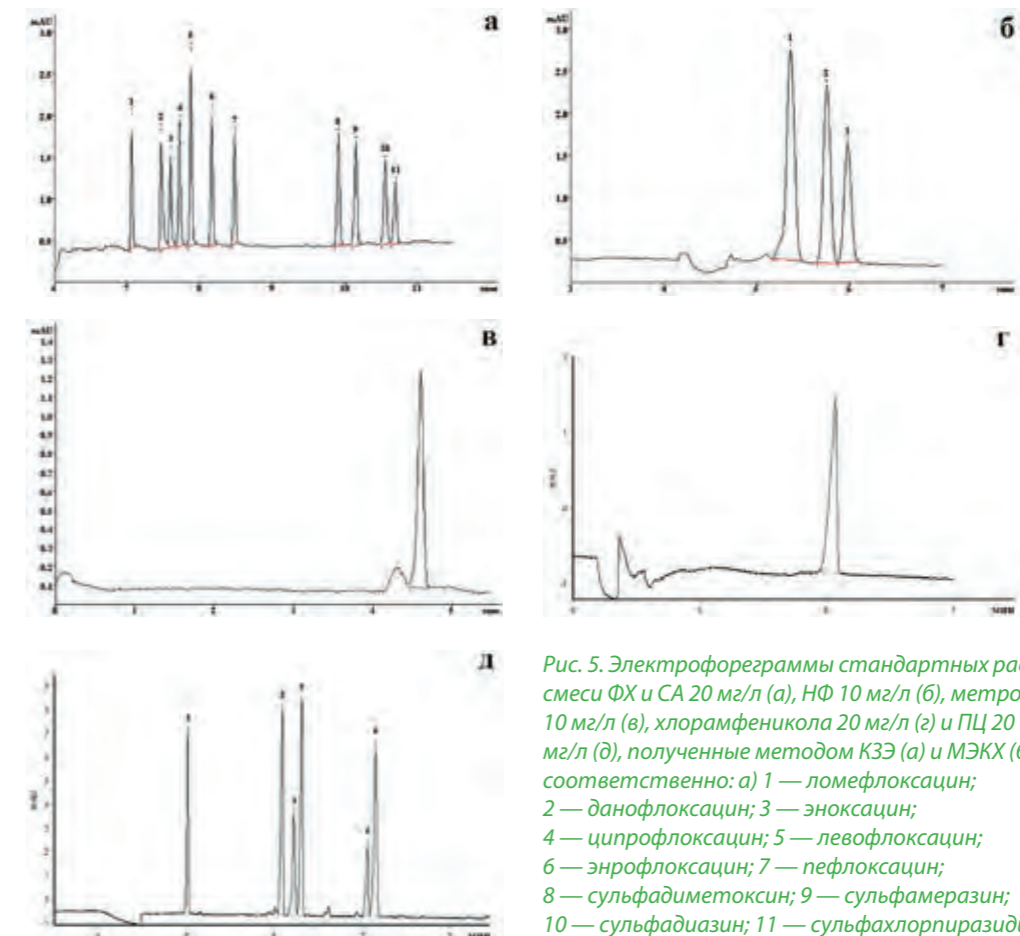


Рис. 5. Электрофореграммы стандартных растворов смеси ФХ и СА 20 мг/л (а), НФ 10 мг/л (б), метронидазола 10 мг/л (в), хлорамфеникола 20 мг/л (г) и ПЦ 20 мг/л (д), полученные методом КЗЭ (а) и МЭКХ (б–д) соответственно: а) 1 — ломефлоксацин; 2 — данофлоксацин; 3 — эноксацин; 4 — ципрофлоксацин; 5 — левофлоксацин; 6 — энрофлоксацин; 7 — пефлоксацин; 8 — сульфадиметоксин; 9 — сульфамеразин; 10 — сульфадиазин; 11 — сульфалорпиразидин; б) 1 — фуразолидон; 2 — нитрофуразон; 3 — фуралтадон; в) метронидазол; г) хлорамфеникол; д) 1 — амоксициллин; 2 — оксациллин; 3 — ампициллин; 4 — клоксациллин; 5 — пенициллин G; 6 — диклоксациллин

Таблица 2
Оптимальные условия электрофоретического разделения смесей антибиотиков различных классов

Смесь антибиотиков	Метод разделения	Условия разделения	Ведущий электролит
Ломефлоксацин, данофлоксацин, эноксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, энрофлоксацин, пефлоксацин, сульфадиметоксин, сульфамеразин, сульфадиазин, сульфаклорпиразидин	КЗЭ	капилляр 75 см × 50 мкм, 280 нм, 35 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	25 мМ фосфатного буферного раствора рН 8,5
Фуразолидон, нитрофуразон, фуралатдон	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 362 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Метронидазол	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 312 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 50 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Хлорамфеникол	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 220 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Амоксициллин, оксациллин, ампициллин, клоксациллин, пенициллин G, диклоксациллин	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 210 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ фосфатного буферного раствора рН 7,0, 30 мМ ДДС

Таблица 3
Аналитические характеристики методики определения ПЦ, ФХ, НФ, СА, метронидазола и хлорамфеникола в ГЛС методом КЭ

№ п/п	Антибиотик	Время миграции, мин.	Уравнение градуировочной характеристики	R ²	Диапазон определяемых содержаний, мг/г
Фторхинолоны и сульфаниламиды					
1	Ломефлоксацин	7,18 ± 0,19	y = 0.8714 x	0.9999	3–1500
2	Данофлоксацин	7,57 ± 0,23	y = 0.9560 x	0.9989	4–2000
3	Эноксацин	7,70 ± 0,21	y = 1.3590 x	0.9999	5–2000
4	Ципрофлоксацин	7,81 ± 0,23	y = 0.8662 x	0.9999	3–1500
5	Левофлоксацин	7,97 ± 0,24	y = 0.8463 x	0.9996	3–2000
6	Энрофлоксацин	8,30 ± 0,23	y = 0.8245 x	0.9999	4–2000
7	Пефлоксацин	8,63 ± 0,23	y = 0.9123 x	0.9998	4–1500
8	Сульфадиметоксин	9,97 ± 0,28	y = 0.7725 x	0.9997	4–2000
9	Сульфамеразин	10,16 ± 0,31	y = 0.7642 x	0.9998	5–2000
10	Сульфадиазин	10,54 ± 0,32	y = 1.0321 x	0.9997	6–2000
11	Сульфаклорпиразидин	10,66 ± 0,34	y = 1.4685 x	0.9997	10–2500
Нитрофураны					
12	Фуразолидон	5,17 ± 0,05	y = 0.1017 x	0.9999	2–1000
13	Нитрофуразон	5,50 ± 0,05	y = 0.1458 x	0.9999	2–1000
14	Фуралатдон	5,69 ± 0,05	y = 0.1971 x	0.9999	3–1500
Пенициллины					
15	Амоксициллин	5,01 ± 0,06	y = 0.2249 x	0.9997	2–2000
16	Оксациллин	6,09 ± 0,06	y = 0.1243 x	0.9999	1–2000
17	Ампициллин	6,22 ± 0,10	y = 0.1894 x	0.9999	2–1500
18	Клоксациллин	6,31 ± 0,11	y = 0.1169 x	0.9998	1–2000
19	Пенициллин G	7,06 ± 0,11	y = 0.3171 x	0.9998	4–2000
20	Диклоксациллин	7,15 ± 0,13	y = 0.1093 x	0.9998	1–2000
Метронидазол, хлорамфеникол					
21	Метронидазол	4,67 ± 0,04	y = 1.7626 x	0.9998	2–1000
22	Хлорамфеникол	6,04 ± 0,06	y = 0.3221 x	0.9999	4–2500

Таблица 4
Результаты анализа ГЛС коммерческого изготовления (n = 4, P = 0,95)

№ п/п	Обезличенный и закодированный образец ГЛС	Заявленное содержание действующего вещества, мг (%)	Установленное содержание действующего вещества, мг (%)	
			X _{ср} ± ΔX	S _r
1	Образец № 1	250	241 ± 14	0,02
2	Образец № 2	500	292 ± 17	0,02
3	Образец № 3	500	241 ± 9	0,01
4	Образец № 4	20	19 ± 1	0,02
5	Образец № 4 (просроч.)	20	22 ± 1	0,01
6	Образец № 5	250	211 ± 8	0,02
7	Образец № 6	(0,25)	0,18 ± 0,01	0,03
8	Образец № 7	(0,25)	0,11 ± 0,01	0,01
9	Образец № 8	500	377 ± 20	0,03
10	Образец № 9	50	34 ± 2	0,02
11	Образец № 10	5	5,7 ± 0,4	0,03
12	Образец № 11	250	285 ± 2	0,01
13	Образец № 12	500	532 ± 14	0,01
14	Образец № 13	250	246 ± 16	0,03

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментальные данные показывают возможность применения метода капиллярного электрофореза для идентификации и определения содержания антибиотиков в ГЛС с целью контроля качества фармацевтической продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. — Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. — 104 с.
- Amin A.S., El-Ansary A.L., Issa Y.M. Colorimetric determination of amoxicillin in pure form and in pharmaceutical preparations // Talanta. — 1994. — Vol. 41, № 5. — P. 691–694.
- El-Shabrawy Y. Fluorimetric determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceutical preparations and biological fluids // Spectroscopy Letters. — 2002. — Vol. 35, № 1. — P. 99–109.
- Emara K.M., Askal H.F., Saleh G.A. Spectrophotometric determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations // Talanta. — 1991. — Vol. 38, № 11. — P. 1219–1221.
- Jiang T.F., Lv Z.H., Wang Y.H. Separation and determination of nitrofurantoin antibiotics in turbot fish by microemulsion electrokinetic chromatography // Anal. Sci. — 2009. — Vol. 25. — P. 861–864.
- Khashaba P.Y. Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 27. — P. 923–932.
- Kothekar K. M., Jayakar B., Khandhar A. P. Quantitative determination of levofloxacin and ambroxol hydrochloride in pharmaceutical dosage form by reversed-phase high performance liquid chromatography // Eurasian J. Anal. Chem. — 2007. — Vol. 2. — P. 21–31.
- Liquid chromatography — tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review / M. Petrovic, M. D. Hernando, M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo // J. Chromatogr. A. — 2005. — Vol. 1067. — P. 1–14.
- Lu H., Wu X., Xie Z. Separation and determination of seven fluoroquinolones by pressurized capillary electrochromatography // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 2210–2217.
- Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis / C.E. Lin, W.C. Lin, Y.C. Chen, S.W. Wang // J. Chromatogr. A. — 1997. — Vol. 792. — P. 37–47.
- Monser L., Darghouth F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2000. — Vol. 23. — P. 353–362.
- Niessen W.M.A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography — mass spectrometry // J. Chromatogr. A. — 1998. — Vol. 812. — P. 53–75.
- Pajchel G., Pawłowski K., Tyski S. CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 29. — P. 75–81.
- Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β-lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations // Anal. Chim. Acta. — 2004. — Vol. 515. — P. 333–341.
- Samanidou V.F., Demetriou C.E. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 375. — P. 623–629.
- Schmitt-Kopplin P., Burhenne J., Freitag D. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase // J. Chromatogr. A. — 1999. — Vol. 837. — P. 253–265.
- Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / M. Lombardo-Agui, L. Gamiz-Gracia, A.M. Garcia-Campana, C. Cruces-Blanco // Anal. Bioanal. Chem. — 2010. — Vol. 396. — P. 1551–1557.
- <http://rupest.ru/ppdb/metronidazole.html>

ВНЕДРЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ 454 LIFE SCIENCES В ЛАБОРАТОРНУЮ ПРАКТИКУ

Н.Г. Зиняков¹, Е.В. Овчинникова², С.П. Лазарева³, А.А. Козлов⁴, И.А. Чвала⁵

¹ научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zinyakov@arriah.ru

² младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Показана возможность применения высокопроизводительного пирофосфатного секвенирования, также известного как технология 454 Life Sciences, для исследования высоковариабельных и малоизученных инфекционных агентов вирусной природы. Определены полногеномные нуклеотидные последовательности вирусных инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита, аденовируса птиц генотипа С и аденоассоциированного вируса птиц. Идентифицированы рекомбинации в геноме инфекционного бронхита кур, выявлены структурные и точечные мутации в геноме аденовируса птиц. Охарактеризована структура генома вируса инфекционного ларинготрахеита и аденоассоциированного вируса птиц.

Ключевые слова: инфекционный бронхит кур, инфекционный ларинготрахеит, аденовирус птиц, аденоассоциированный вирус птиц, геном, нуклеиновые кислоты, секвенирование.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для решения широкого круга научно-исследовательских задач активно используют методы высокопроизводительного секвенирования. Совокупность новых методов также называют секвенированием второго поколения или Next Generation Sequencing (NGS). Области применения технологий NGS охватывают работы, связанные с полногеномным секвенированием, таргетным секвенированием, анализом транскриптома и метагеномными исследованиями [7, 8]. NGS-технологии позволяют проводить работу без расчета праймеров за счет случайной фрагментации исходной ДНК и секвенирования полученной библиотеки, представляют огромные преимущества для работы с вариабельными и малоизученными инфекционными агентами. Первым методом, заложенным в основу высокопроизводительного секвенирования, было пирофосфатное секвенирование. Метод был основан на детекции флуоресцентного сигнала в результате разрушения пирофосфата (побочного продукта при синтезе ДНК) и являлся методом секвенирования путем синтеза. Впоследствии метод активно модифицировали и оптимизировали, что привело к созданию технологии 454 Life Sciences, также известной как «454 sequencing» (секвенирование 454). Отличительной особенностью

данной технологии среди других технологических решений в области высокопроизводительного секвенирования стала наибольшая длина единичных прочтений, что позволило применять ее для работ как с уже известными, так и с малоизученными организмами, поскольку, получая более длинные прочтения, выполнять сборку изучаемого генома можно при меньшем объеме данных и получать достоверные результаты при более низком покрытии. Однако использование NGS-технологий для расшифровки вирусных геномов сопряжено с рядом трудностей. Основная сложность заключается в очистке вируса от клеточного матрикса. В случае если очистка проведена некачественно, выход интересующих данных может оказаться незначительным и недостаточным для полноценного анализа. С целью увеличения информации об исследуемом объекте в генерируемом массиве данных проводят ряд дополнительных процедур по очистке и концентрации целевого объекта, например, иммунопреципитацию вирусных частиц, градиентное центрифугирование, выделение нуклеиновой кислоты с помощью вичипов со специальными зондами, а также дополнительную амплификацию со специфичными праймерами. Учитывая последующую сложную обработку полученного массива данных, наличие в геноме вирусов различных повторов и в целом более высокую вариабельность при анализе уже изученных вирусов, большая длина единичных прочтений упрощает дальнейшую биоинформатическую обработку.

Целью данной работы было изучение возможности применения технологии 454 Life Sciences для расшифровки генома возбудителей вирусных болезней птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вируса инфекционного бронхита кур (ИБК) и инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ) проводили с использованием СПФ-эмбрионов кур путем заражения суспензией патологического материала в аллантоисную полость и на хориоаллантоисную оболочку соответственно.

Аденовирус птиц выделяли с использованием периваемой культуры клеток гепатоцеллюлярной карциномы петуха (LMH). Для культивирования использо-

вали поддерживающую среду (рН 7,8), состоящую из питательной среды DMEM (Sigma, США) с добавлением фетальной сыворотки (Bioclot, Бразилия), в количестве 2% от общего объема, среды и раствора L-глутамина (Sigma, США) с конечной концентрацией 1% активного вещества.

Очистку вируса от клеточного матрикса проводили с использованием ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы.

Для выделения РНК и ДНК из очищенного материала применяли набор для выделения нуклеиновых кислот RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Суммарную нуклеиновую кислоту вируса ИБК переводили в двухцепочечную кДНК, используя набор cDNA Synthesis System (Roche, Германия) согласно инструкции изготовителя.

Полногеномное секвенирование проводили методом пирофосфатного секвенирования 454 Life Sciences на автоматическом секвенаторе GS Junior (Roche, Германия) согласно протоколам изготовителя. Для сборки вирусного генома использовали программное обеспечение GS De Novo Assembler (454 Life Science Corp.) и GS Reference Mapper (454 Life Science Corp.). Для выявления рекомбинаций использовали программу Recombination Detection Program (RDP), версия 3.44.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах по применению технологии 454 Life Sciences для расшифровки вирусных геномов было использовано несколько различных вирусов, имеющих определенные особенности в геномной организации. Первый эксперимент был проведен с возбудителем инфекционного бронхита кур (ИБК). Вирус ИБК относится к роду *Gammacoronavirus*, подсемейству *Coronavirinae*, семейству *Coronaviridae*, порядку *Nidovirales*. Особенностью данного возбудителя является генетическое разнообразие и высокая скорость изменчивости. Уровень нуклеотидных отличий между изолятами разных генетических групп составляет более 20%, кроме того, встречаются варианты изоляты вируса ИБК, отличающиеся от всех референтных штаммов и не относящиеся ни к одному известному генотипу. Изменения в геноме вируса ИБК происходят в результате накопления точечных мутаций, инсерций, делеций и рекомбинаций. Рекомбинация происходит при инфицировании одной клетки разными штаммами вируса. При этом дочерний вирус может иметь фрагменты генома родительских вирусов разных генотипов, включая вакцинные штаммы [3].

Для полногеномного секвенирования был выбран изолят IBV27-11 вируса ИБК, поскольку по результатам анализа нуклеотидной последовательности на участке гена S1 данного изолята была выявлена рекомбинация [3]. В полногеномном анализе было использовано 4542 единичных прочтения, из которых была собрана последовательность размером 27577 п.н. Анализ полученной нуклеотидной последовательности с помощью программы RDP позволил выявить мозаичную структуру генома с пятью рекомбинационными событиями (рис. 1).

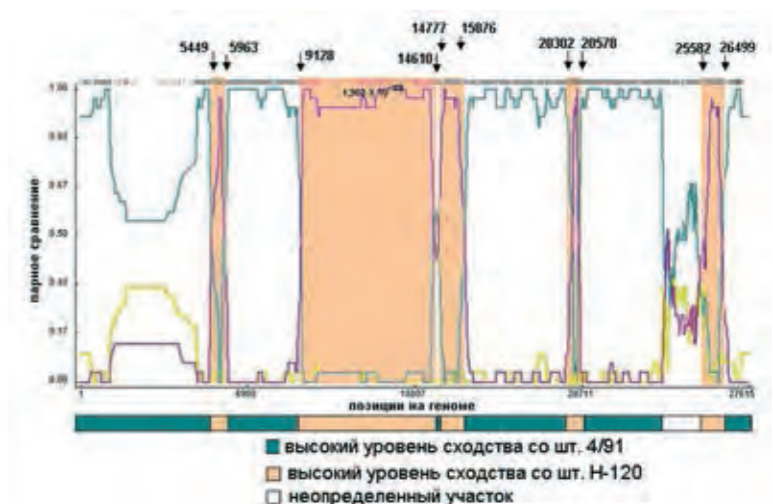
Попытки собрать геном вируса ИБК по алгоритму картирования на известную референтную последовательность с использованием программы GS Reference Mapper (454 Life Science Corp.) оказались безуспешны, при этом число собранных контигов варьировало от 5 до 14 в зависимости от использованной референтной

последовательности. Полученный результат демонстрирует необходимость использования алгоритмов сборки *de novo* для объектов с ожидаемой внутри- или межгеномной рекомбинацией.

Для изучения возможности применения технологии 454 Life Sciences для анализа вирусов, имеющих в геноме незначительные по размеру повторяющиеся мотивы, был исследован полевой изолят аденовируса птиц. Аденовирус птиц — широко распространенный инфекционный агент, относящийся к семейству *Adenoviridae*, роду *Aviadenovirus*. Наиболее известными болезнями птиц, вызываемыми аденовирусами и имеющими характерные патологоанатомические признаки, являются гепатит (IBH-inclusion body hepatitis) и синдром гидроперикардита (HNS-hepatitis-hydropericardium syndrome) [4]. Стоит отметить, что несмотря на то, что аденовирусы являются распространенными инфекционными агентами, на настоящий момент у аденовирусов птиц изучены и охарактеризованы лишь отдельные протеины. В данной работе был использован изолят «Краснодар 2009», выбор был обусловлен результатами предварительной работы [1]. В результате анализа нуклеотидных последовательностей генов фибер-1 и фибер-2 было показано отличие выделенного изолята от известных штаммов, в том числе от референтного штамма KR95. Отличия на генетическом уровне обусловлены как точечными заменами (1,4% отличия), так и структурными мутациями (1,2%). Из точечных замен 30% являются значимыми (0,36% от общего уровня отличий). Количество аминокислотных замен, выявленных у изолята «Краснодар 2009», в сравнении со штаммом KR95 по всем предполагаемым открытым рамкам считывания (ОРС) в результате точечных замен составило 168. Среди структурных мутаций были выявлены как незначительные по размеру делеции и вставки, так и крупные структурные мутации длиной до 147 п.н. Также были выявлены две вставки-дубликации. Генетические мутации типа инверсии и рекомбинации выявлены не были. Структурные мутации были отмечены как в кодирующей, так и в некодирующей части генома.

Незначительные по размеру структурные мутации (инсерции и делеции), затрагивающие предполагаемые рамки, были выявлены как среди гипотетических ранее предложенных рамок считывания, так и среди изучен-

Рис. 1. Мозаичная структура вируса ИБК, полученная с помощью программы RDP



	14720	14730	14740	14750	14760	14770	14780	14790	14800	14810
Fowl adenovirus C	K D R K									
Fowl adenovirus C	· H ·									
Fowl adenovirus I	· N H ·									
Fowl adenovirus C	· N H ·									
Krasnodar De Novo	R H H ·									
Krasnodar Mapper	R H H ·									

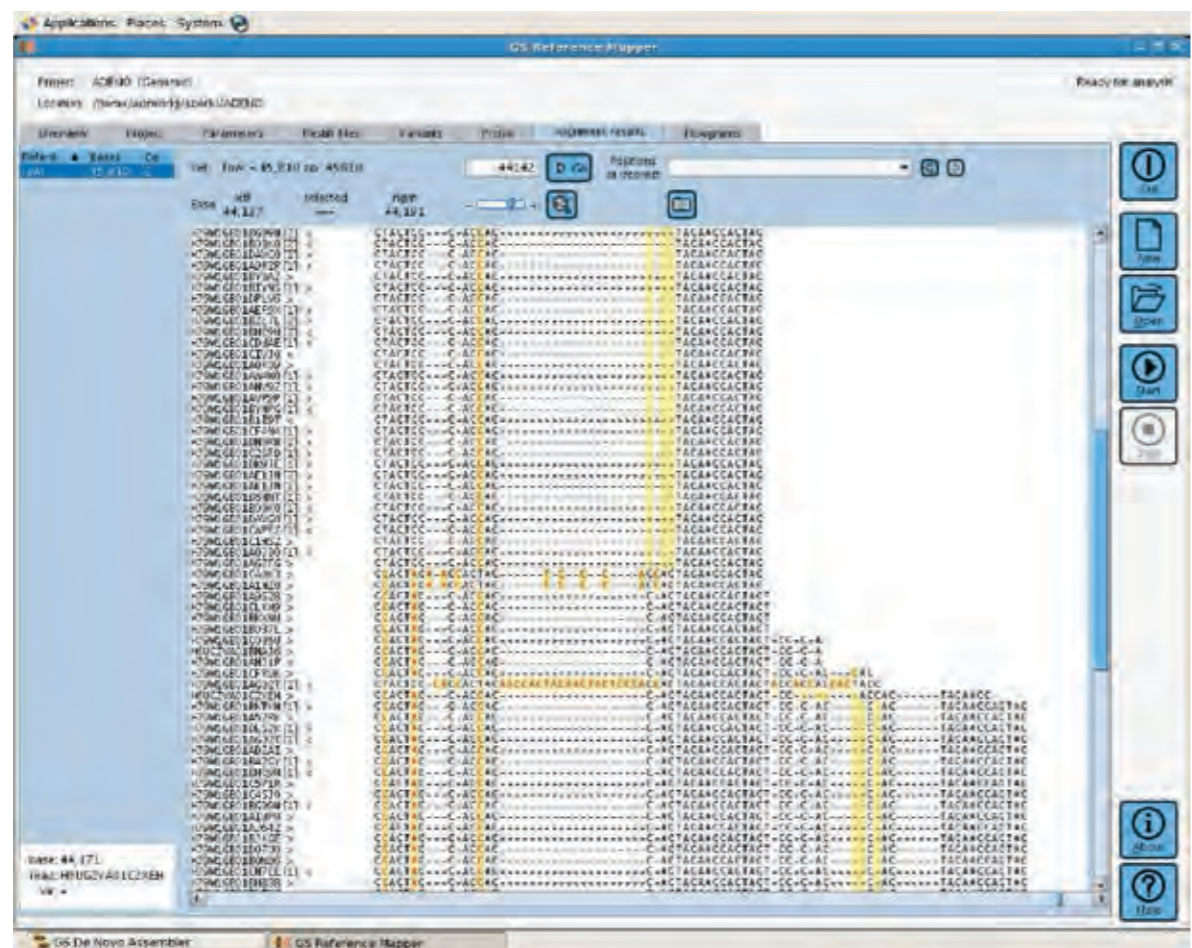
Рис. 2. Участок предсказанной аминокислотной последовательности белка 100 кДа аденовирусов птиц

ных протеинов (гены белков фибер-1, фибер-2, пентон, ДНК-полимераза).

При анализе полученного массива данных для участка генома, содержащего повторяющиеся генетические мотивы, были выявлены различия в полученных результатах. В частности, при анализе путем картирования на референтную последовательность в первичной нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательности были выявлены различные одиночные замены, а также отсутствовала инсерция размером 60 п.н. (рис. 2).

Эти различия, по всей видимости, обусловлены иным алгоритмом обработки данных, используемым программой GS Reference Mapper. Здесь стоит отметить полезность функции визуализации полученных результатов в программах, используемых для анализа данных, поскольку выявленная гетерогенность исследованного участка статистически подкрепляется и могла бы быть расценена как истинная гетерогенность исследован-

Рис. 3. Скриншот результатов анализа массива данных с помощью программного обеспечения GS Reference Mapper



ного образца. Однако благодаря визуализации результатов можно отметить наличие характерной «обрезки» анализируемых прочтений по одной точке на всем массиве данных (рис. 3). Обнаружение подобной «обрезки» сборки указывает на потенциальные структурные изменения у исследуемого объекта (наличие инсерции, делеции, рекомбинации) и необходимость дополнительного анализа.

Кроме этого, при использовании алгоритма сборки *de novo* среди собранных контигов был выявлен фрагмент, который по результатам анализа был идентифицирован как аденоассоциированный вирус [2]. В результате сравнительного анализа собранного генома были выявлены характерные гены аденоассоциированных вирусов (ОРС неструктурного протеина «*rep protein*» и структурных белков «*cap protein*») [5]. Размер ОРС «*rep protein*» составил 1992 п.н. Процент сходства нуклеотидной последовательности ОРС «*rep protein*» составил 92, 95, 94% со штаммами VR-865 (AY629582), DA-1 (AY629583), YZ-1 (GQ368252) соответственно. Размер ОРС изолята ZN-1 «*cap protein*» составил 2232 п.н. Процент сходства нуклеотидной последовательности ОРС «*cap protein*» составил 87, 95, 95% со штаммами VR-865, DA-1, YZ-1 соответственно. Собранный геном изолята ZN-1 был депонирован в GenBank под номером KF937794. Таким образом, использование алгоритма сборки *de novo* является более целесообразным, по-

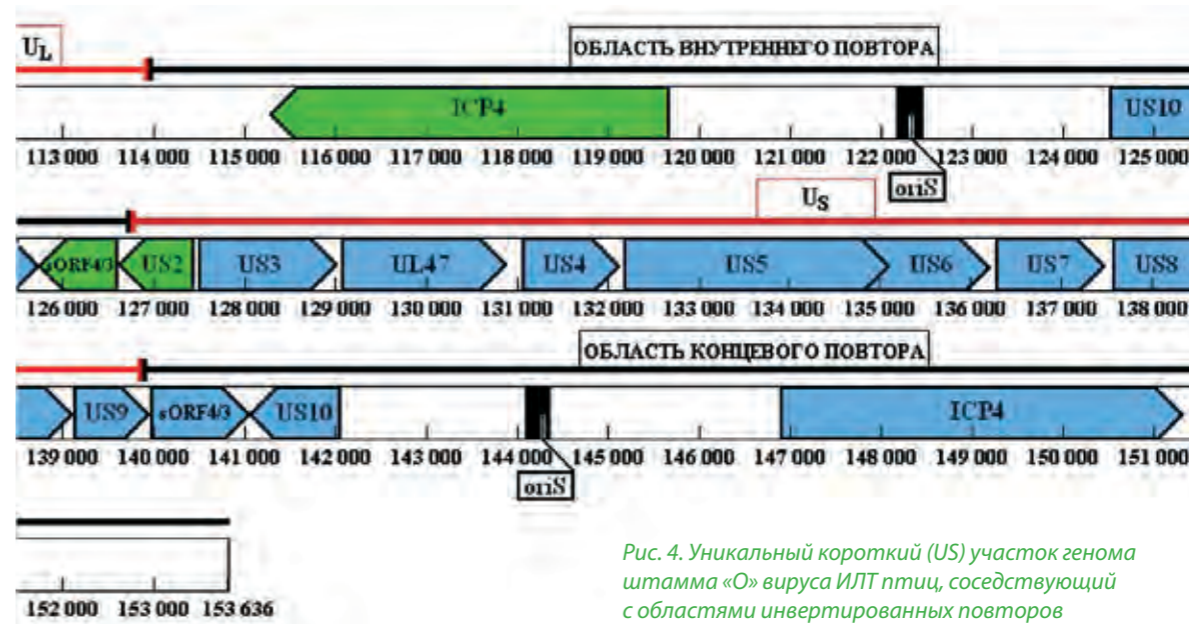


Рис. 4. Уникальный короткий (US) участок генома штамма «О» вируса ИЛТ птиц, соседствующий с областями инвертированных повторов

скольку позволяет исследовать вирусы со структурными мутациями, такими как рекомбинации, делеции, инсерции, а также позволяет выявлять вирусы-сателлиты.

Проведенные работы также показали возможность применения технологии 454 Life Sciences для анализа вирусов, в геноме которых содержатся инвертированные повторы. Вирус ИЛТ вызывает у кур острое респираторное заболевание. Возбудитель — ДНК-содержащий вирус семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Alphaherpesvirinae*. Вирусные частицы имеют нуклеокапсиды диаметром 80–100 нм с икосаэдральной симметрией, полная вирусная частица диаметром 195–250 нм. Двухцепочечная линейная ДНК вируса размером 155 тысяч п.н. включает уникальные длинные и короткие участки, соседствующие с инвертированными повторами.

Для исследования был использован вакцинный штамм «О» вируса ИЛТ. Размер полученного генома составил 153636 п.н. Уникальный длинный (UL) и уникальный короткий (US) участки в ДНК составили 113921 п.н. и 13093 п.н. в длину соответственно. Уникальный короткий участок окружен внутренним (113922–126732 п.н.) и концевым (139826–153635 п.н.) инвертированными повторами в последовательности ДНК вируса ИЛТ птиц (рис. 4).

В областях инвертированных повторов находятся гены, кодирующие регуляторный белок ICP4, вирионный белок US10, а также *oriS* участки, которые имеют палиндромную организацию и содержат сайты инициации репликации вирусной ДНК [6]. При анализе результатов секвенирования вируса ИЛТ более приемлемым оказался алгоритм картирования полученных прочтений на референтную последовательность. Проведенная работа указывает на необходимость грамотного подбора алгоритмов последующего анализа данных, полученных с помощью технологии 454 Life Sciences, при осуществлении работ, связанных с расшифровкой вирусных геномов, имеющих свои специфические особенности.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показали возможность использования технологии 454 Life Sciences для исследования высоковариабельных в генетическом плане инфекционных агентов, проведения изучения вирусов, значительно отличающихся от референтных штаммов и имеющих межгеномные рекомбинации. Показано,

что для анализа полученных массивов данных целесообразно использование алгоритма сборки *de novo* при работе с вирусами, геном которых может содержать структурные мутации, повторяющиеся мотивы, геномные рекомбинации, тогда как для анализа вирусов с протяженными инвертированными геномными повторами более подходящим является алгоритм сборки картирования на референтную последовательность.

Таким образом, внедрение нового высокотехнологичного оборудования, использующего NGS-технологии, открывает дополнительные возможности в изучении генетических свойств вновь появляющихся и малоизученных микроорганизмов, а также возбудителей особо опасных болезней животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетический анализ изолята аденовируса птиц «Краснодар 2009» / О.С. Осипова, Н.Г. Зиняков, И.А. Чвала, В.В. Дрыгин // Вестник ветеринарии. — 2014. — № 3. — С. 33–37.
2. Зиняков Н.Г. Выявление аденоассоциированных вирусов с помощью NGS-технологии // Молекулярная диагностика. — 2014. — Т. 2. — С. 448–449.
3. Овчинникова Е.В. Молекулярно-биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на территории России в период с 2005 по 2011 гг.: дис. ... канд. биол. наук. — Владимир, 2012. — 116 с.
4. Adair B.M., Fitzgerald S.D. Group 1 adenovirus infections // Diseases of Poultry / ed. Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson [et al.]. — 12th ed. — Ames, Iowa, — 2008. — P. 252–266.
5. Bossis I., Chiorini J.A. Cloning of an Avian Adeno-Associated Virus (AAAV) and Generation of Recombinant AAAV Particles // J. Virol. — 2003. — Vol. 77. — P. 6799–6810.
6. Knopf C.W., Spies B., Kaerner H.C. The DNA replication origins of herpes simplex virus type 1 strain Angelotti // Nucleic Acids Research. — 1986. — Vol. 14, № 21. — P. 8655–8667.
7. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat / E.F. Donaldson, A.N. Haskew, J.E. Gates [et al.] // J. Virol. — 2010. — Vol. 84. — P. 13004–13018.
8. Sequencing viral genomes from a single isolated plaque / J. DePew, B. Zhou, J.M. McCarrison [et al.] // J. Virol. — 2013. — Vol. 10 (181). — doi: 10.1186/1743-422X-10-181.

IMPLEMENTATION OF 454 LIFE SCIENCES TECHNOLOGY LABORATORY PRACTICES

N.G. Zinyakov¹, Ye.V. Ovchinnikova², S.P. Lazareva³, A.A. Kozlov⁴, I.A. Chvala⁵

¹ Researcher, Candidate of sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zinyakov@arriah.ru

² Junior Researcher, Candidate of sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁴ PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁵ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The article demonstrates possibility of using highly productive pyrophosphate sequencing, also known as 454 Life Sciences technology for investigation of highly variable and understudied infectious viral agents. Genome-wide nucleotide sequences of infectious bronchitis virus, infectious laryngotracheitis virus, fowl adenovirus C, and avian adeno-associated virus were determined. Recombinations in infectious bronchitis genome were identified, structural and point mutations in fowl adenovirus genome were detected. Infectious laryngotracheitis virus and avian adeno-associated virus genome structure was characterized.

Key words: infectious bronchitis, infectious laryngotracheitis, fowl adenovirus, avian adeno-associated virus, genome, nucleic acids, sequencing.

INTRODUCTION

In the present time highly productive sequencing techniques are actively used for solving a wide range of scientific and research tasks. Combination of new methods is also called sequencing of the second generation or Next Generation Sequencing (NGS). NGS application field includes genome-wide sequencing, target sequencing, transcriptome analysis and metagenomic tests [7, 8]. NGS-techniques enable sequencing without designed primers due to random DNA fragmentation and sequencing of obtained library and have considerable advantages for investigation of variable and poorly studied agents. The first technique which was the basis of highly productive sequencing was pyrophosphate sequencing. The technique was based on detection of a fluorescent signal as a result of pyrophosphate destruction (byproduct of DNA synthesis) and was a sequencing technique by synthesis. Later the technique was actively modified and optimized and as a result 454 Life Sciences technology, also known as «454 sequencing», was created. The distinctive feature of this technology differentiating it from other technological solutions in the field of highly productive sequencing was the longest read size that could be used for tests involving

both already known and poorly investigated organisms as due to longer reads it is possible to design a DNA sequence assembly at a lesser data volume and get reliable results at a lower coverage. However, using NGS technologies for decoding viral genomes implies some difficulties. The greatest challenge is virus purification from cell matrix. If purification was performed improperly obtained data can be insufficient for a comprehensive analysis. In order to increase volume of information about the investigated object in a generated database additional measures for target object purification and concentration are taken, such as immunoprecipitation of viral particles, graded-index centrifuging, extraction of nucleic acid using biochips with special probes, as well as additional amplification with specific primers. Considering the subsequent complicated data processing, presence of different repeats in viral genome, and a higher variability in case of analysis of already known viruses, long reads simplify further bio-information processing.

The purpose of the paper was to study the possibility of using 454 Life Sciences technology for decoding agent genome causing viral avian diseases.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of infectious bronchitis virus and infectious laryngotracheitis is virus was performed using chicken SPF-embryos by inoculating pathological material suspension into an allantoic cavity and a chorioallantoic membrane.

Chicken adenovirus was isolated using passaged cell culture of chicken hepatocellular carcinoma (LMH). Supporting medium (pH 7,8), containing growth medium DMEM (Sigma, USA) with fetal serum (Bioclot, Brazil), 2% of total volume, medium and L-glutamine solution (Sigma, USA) with 1% final concentration of the active ingredient was used for culturing.

Viral purification from cell matrix was performed using ultracentrifuging in sucrose gradient.

For RNA and DNA isolation from purified material RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany), for nucleic acid isolation was used according to the manufacturer's instruction.

Total nucleic acid of IB was converted in a double-stranded cDNA using cDNA Synthesis System (Roche, Germany) kit according to the manufacturer's instruction.

Whole-genome sequencing was performed using 454 Life Sciences perphosphate sequencing by automatic sequencer GS Junior (Roche, Germany) according to the manufacturer's protocols. For viral genome assembly GS De Novo Assembler (454 Life Science Corp.) software and GS Reference Mapper (454 Life Science Corp.) were used. For detection of recombinations Recombination Detection Program (RDP), 3.44 Version, was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Several different viruses having specific peculiarities in genome organization were used in experiments for implementation of 454 Life Sciences technology for decoding viral genomes. The first experiment was performed using IB agent. IBV belongs to *Gammacoronavirus* genus, *Coronavirinae* subfamily, *Coronaviridae* family, *Nidovirales* order. This agent is characterized by genetic diversity and high variability. The level of nucleotide differences between isolates of different genetic groups is more than 20%. Besides, there are IBV variant isolates which differ from all reference strains and don't belong to any known genotype. Changes in IBV genome result from point mutation accumulation, insertions, deletions and recombination. Recombination results from infecting one cell with different virus strains. Herewith, "daughter" virus can have fragments of parent virus genomes of different genotypes including vaccine strains [3].

IBV27-11 isolate of IBV was chosen for full genome sequencing as due to results of nucleotide sequencing analysis a recombination was detected in S1 gene site [3]. 4542 reads were used in full genome analysis from which a 27 577 b.p. sequence was assembled. Analysis of obtained nucleotide sequence using RDP programme made it possible to detect a genome mosaic structure with five recombination events (Fig. 1).

Attempts to assemble IBV genome according to mapping algorithm against a known referent sequence using GS Reference Mapper programme (454 Life Science Corp.) were unsuccessful and the number of obtained contigs varied from 5 to 14 depending on the used reference se-

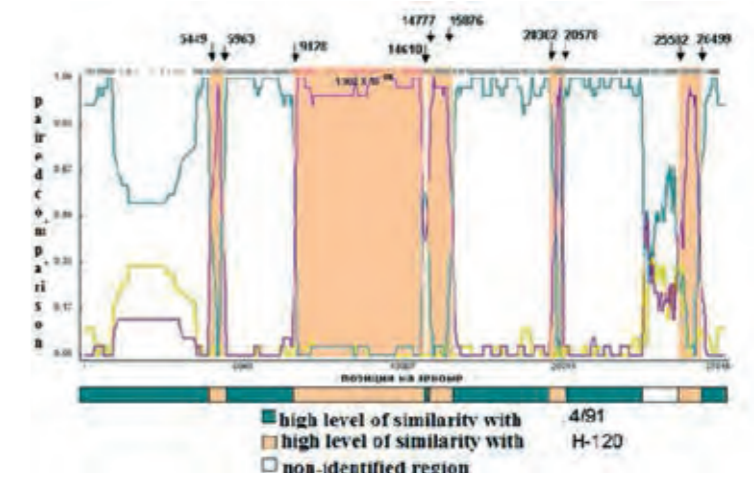


Fig. 1. IBV mosaic structure obtained using RDP programme

quence. The result demonstrates necessity to use assembly algorithms *de novo* for objects with expected intra- and intergenomic recombinations.

To study the possibility of using 454 Life Sciences technology for analysis of viruses having minor repeating motifs a field isolate of avian adenovirus was studied.

Avian adenovirus is a widely spread infectious agent belonging to *Adenoviridae* family, *Aviadenovirus* genus. «IBH»-inclusion body hepatitis and «HHS»-hepatitis-hydropericardium syndrome are the most popular avian diseases caused by adenoviruses and characterized by specific pathological signs [4]. It should be noted that despite adenoviruses are widely spread infectious agents today only some proteins of avian adenoviruses have been studied and characterized. «Krasnodar 2009» isolate was used in this investigation. The choice was conditioned by the results of previous work [1]. Analysis of fiber-1 and fiber-2 nucleotide sequences demonstrated difference between the recovered isolate from known strains including KR95 reference strain. Genetic differences are conditioned by point mutations (1,4% difference) as well as structural mutations (1,2%). 30% of point mutations are meaningful (0,36% of the general difference level). Number of amino acid substitutions detected in «Krasnodar 2009» isolate, in comparison with KR95 strain, in all open reading frames as a result of point mutations was 168. Among structural mutations slight deletions and insertions as well as large structural mutations 147 base pairs were detected. Also two insertion duplications were detected. Genetic mutations of inversion and recombination types were not detected. Structural mutations were noticed both in decoding and non-decoding parts of a genome.

Slight structural mutations (insertions and deletions), involving supposed frames were detected both among hypothetical, previously suggested reading frames as well as

Fig. 2. Region of deduced amino acid sequence of fowl adenovirus 100-kDa protein



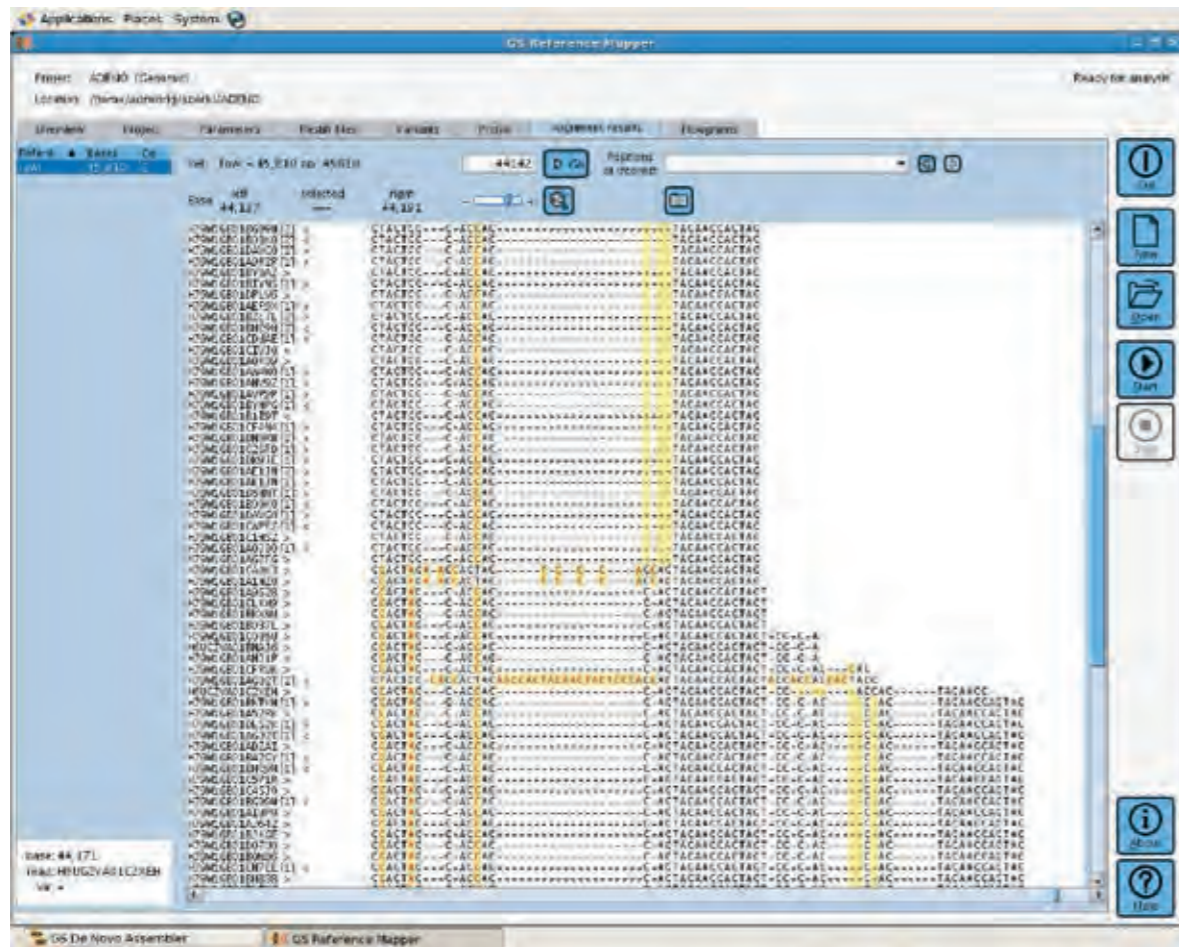


Fig. 3. Screen shot of data volume analysis results using GS Reference Mapper software

among studied proteins (genes of proteins fiber-1, fiber-2, penton, DNA-polymerase).

During analysis of obtained data for a genome region containing repeated genetic motifs discrepancies in obtained results were detected. In particular, in case of mapping to a reference sequence in primary nucleotide and deduced amino acid sequence different single substitutions were detected. Also no 60 b.p. insertion was observed. (Fig. 2).

Evidently, these discrepancies are conditioned by another algorithm of data processing used by GS Reference Mapper software. It should be noted that visualization of obtained results is a useful function of programs used for data analysis as detected heterogeneity of the investigated region is statistically enforced and could be assessed as genuine heterogeneity of the tested sample. However, specific "cuts" of analyzed readings at one site of all data volume can be observed due to visualization of results (Fig. 3). Detection of such assembly "cuts" is indicative of potential structural changes of the tested object (presence of insertions, deletions, recombinations) and necessity to perform additional analysis.

Besides, when using assembly algorithm *de novo* a fragment which was identified as adeno-associated virus on the analysis results was detected among assembled contigs [2]. As a result of comparative analysis of assembled genome specific genes of adeno-associated viruses were detected (ORF of non-structural protein «rep protein» and structural proteins «cap protein») [5]. «Rep protein» open reading frame (ORF) size of was 1992 b.p. Similarity percentage «rep protein» ORF nucleotide sequence was 92,

95, 94% with strains VR-865 (AY629582), DA-1 (AY629583), YZ-1 (GQ368252), respectively. «Cap protein» ZN-1 isolate ORF size was 2232 b.p. «Cap protein» ORF nucleotide sequence similarity percentage was 87, 95, 95% with strains VR-865, DA-1, YZ-1, respectively. Assembled genome of ZN-1 isolate was deposited to GenBank and number KF937794 was assigned to it. Therefore, implementation of assembly algorithm *de novo* is more advisable as it enables to investigate viruses with structural mutations such as recombinations, deletions, insertions. It also enables to detect virus-satellites.

Performed investigations demonstrated possibility to use 454 Life Sciences technology for analysis of viruses the genome of which contains inverted repeats. ILV causes acute respiratory disease in chicken. The agent is DNA-containing virus of *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily. Viral particles have nuclear capsids with 80–100 nm diameter with icosahedral symmetry, whole virus particle of 195–250 nm diameter. Double-stranded linear DNA of the virus, 155 thousand b.p., contains unique long and short regions neighboring inverted repeats.

ILV vaccine strain «O» was used for testing. The size of obtained genome was 153 636 b.p. Unique low (UL) and unique short (US) segments of DNA were 113921 b.p. и 13093 b.p. respectively. Unique short segment is surrounded by inner (113922–126732 b.p.) and terminal (139826–153635 b.p.) inverted repeats in avian ILV DNA sequence (Fig. 4).

Inverted repeat regions contain genes, encoding regulatory protein ICP4, virion protein US10, as well as oriS segments, which have a palindromic structure and contain sites of viral DNA replication [6]. Analysis of ILV sequencing results demonstrated that most acceptable was algorithm of mapping obtained reads to reference sequence. Per-

formed investigations show that it is necessary to properly select algorithms for subsequent analysis of data obtained using 454 Life Sciences technology when performing investigations related to decoding virus genomes having their specific peculiarities.

CONCLUSIONS

Obtained results demonstrated the possibility to use 454 Life Sciences technology for investigating genetically highly variable infectious agents, investigation of viruses, which are considerably different from reference strains and which have intergenomic recombinations. It was shown that for data volume analysis it is advisable to use assembly algorithm *de novo* in investigation of viruses genome of which can contain structural mutations, repeated motifs, genomic recombinations while for analysis of viruses with long inverted genomic repeats more suitable is algorithm of assembly of mapping to reference sequence.

Therefore, new high-technology equipment using NGS technologies gives additional opportunities for studying genetic properties of emerging and understudied microorganisms as well as agents of highly dangerous diseases.

BIBLIOGRAPHY

1. Genetic analysis of fowl adenovirus isolate «Krasnodar 2009» / O. S. Osipova, N. G. Zinyakov, I. A. Chvala, V. V. Drygin // *Vestnik Veterinarii*. — 2014. — № 3. — P. 33–37.

2. Zinyakov N. G. Detection of adeno-associated viruses using NGS-techniques // *Molecular Diagnostics*. — 2014. — Vol. 2. — P. 448–449.

3. Ovchinnikova Ye. V. Molecular and biological properties of IBV isolates detected in Russia in 2005–2011: thesis. ... candidate of science (Biology). — Vladimir, 2012. — 116 p.

4. Adair B. M., Fitzgerald S. D. Group 1 adenovirus infections // *Diseases of Poultry* / ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson [et al.]. — 12th ed. — Ames, Iowa, — 2008. — P. 252–266.

5. Bossis I., Chiorini J. A. Cloning of an Avian Adeno-Associated Virus (AAAV) and Generation of Recombinant AAAV Particles // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 6799–6810.

6. Knopf C. W., Spies B., Kaerner H. C. The DNA replication origins of herpes simplex virus type 1 strain Angelotti // *Nucleic Acids Research*. — 1986. — Vol. 14, № 21. — P. 8655–8667.

7. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat / E. F. Donaldson, A. N. Haskew, J. E. Gates [et al.] // *J. Virol.* — 2010. — Vol. 84. — P. 13004–13018.

8. Sequencing viral genomes from a single isolated plaque / J. DePew, B. Zhou, J. M. McCarrison [et al.] // *J. Virol.* — 2013. — Vol. 10 (181). — doi: 10.1186/1743-422X-10-181.

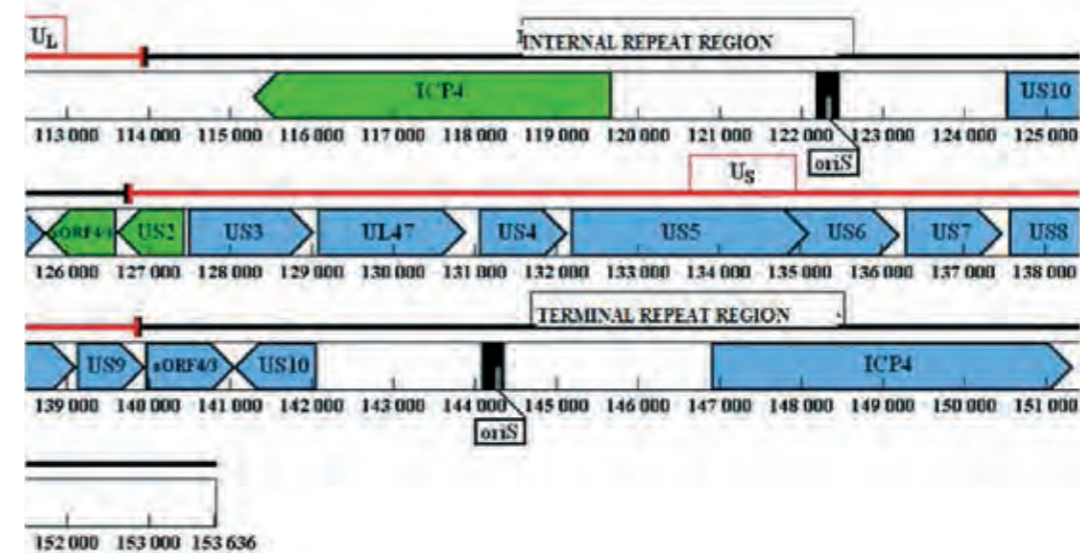


Fig. 4. Unique short (US) segment of avian strain «O» ILV genome neighboring inverted repeat regions

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *EPERYTHROZON SUIS* НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

М.В. Бирюченкова¹, А.М. Тимина²

¹ научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chelysheva@arriah.ru

² старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: timina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработан метод обнаружения *Eperythrozoon suis*, основанный на ПЦР с электрофоретической детекцией. С использованием разработанного метода в 2004–2013 гг. проведены исследования по выявлению *Eperythrozoon suis*. Возбудитель обнаруживается в пробах цельной крови, отобранных у ремонтных свинок и свиноматок.

Ключевые слова: *Eperythrozoon suis*, ПЦР, эперитрозооз.

ВВЕДЕНИЕ

Гемотрофные микоплазмы представляют собой особый кластер близкородственных бактерий в пределах рода *Mycoplasma*. Находясь на поверхности эритроцитов, эти бактерии повреждают их мембраны, что приводит к деформации и разрушению эритроцитов, развитию анемии и повреждению эпителия кровеносных сосудов [5, 7].

Среди гемотрофных микоплазм, поражающих животных, важным для изучения является вид *Eperythrozoon suis*, являющийся этиологическим агентом эперитрозооза свиней [3]. К возбудителю восприимчивы свиньи всех возрастов, но особенно предрасположены к заболеванию поросята группы откорма, у которых *Eperythrozoon suis* (*E. suis*) вызывает кратковременное повышение температуры тела, бледность кожных покровов и единичные случаи желтухи [3, 5]. У животных с хроническим течением заболевания клинические признаки сильно варьируют: у поросят-сосунков наблюдаются анемия, желтушность, апатия, отсутствие аппетита, у поросят на откорме отмечается задержка в росте и развитии, у свиноматок снижаются их воспроизводительные качества [3, 4, 5, 7].

Инфекция, вызываемая *E. suis*, широко распространена за рубежом в хозяйствах с интенсивным ведением свиноводства. Мониторинг состояния здоровья животных в Китае показал, что это заболевание встречается

86% свиней [6]. Превалентность инфицированных стад в Японии составляет 7,5% [8]. В Германии 40,3% обследованных стад были положительными в отношении *E. suis* [7]. Возбудитель присутствует более чем в 33% свиных стад Бразилии [2]. Кроме того, заболевание зарегистрировано в Англии, Чехии, Франции, Канаде.

Экономический ущерб от эперитрозооза сводится к потерям от снижения приростов массы тела и развитию вторичных инфекций на фоне иммунодефицита [7].

За рубежом для лабораторной диагностики заболевания используют такие методы, как традиционная ПЦР, ПЦР в реальном времени, ИФА, реакция связывания комплемента, реакция непрямой геммагглютинации. Также с данной целью проводят гистопатологические и гематологические исследования [1, 3, 4, 5, 6].

Данных о распространении эперитрозооза в Российской Федерации до недавнего времени не было, что в определенной степени было обусловлено отсутствием современных отечественных диагностикомов.

Цель данной работы заключалась в разработке метода обнаружения *E. suis* в патологическом материале от свиней и применении этого метода в лабораторной диагностике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Патологический материал. Для диагностических исследований использовали свежие или замороженные кусочки внутренних органов и цельную кровь от свиней с признаками анемии, лихорадки и желтухи, а также абортинированные плоды и плаценту от свиноматок при репродуктивной патологии.

Бактерии. Для проверки аналитической специфичности теста использовали следующие виды бактерий: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharingis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

Нуклеотидные последовательности. В работе использовали имеющиеся в базе данных GenBank нуклеотидные последовательности *E. suis*. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета прикладных программ BioEdit.

Выделение ДНК из 10%-ной суспензии образцов патологического материала осуществляли с использованием 6 М гуанидинизотиоцианата и стекловолоконных фильтров GF/F.

Полимеразная цепная реакция. Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ Mg²⁺, 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы, по 5 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до конечного объема 50 мкл. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала 35 циклов при следующем температурном режиме: 30 сек. денатурации при 94°C, 30 сек. отжига праймеров при 55°C и 40 сек. элонгации при 72°C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2,0%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геном *E. suis* содержит как области, общие для разных видов микоплазм, так и видоспецифичные участки. В качестве мишени для ПЦР был выбран ген, отличающийся в пределах вида достаточно высокой консервативностью, но не встречающийся у других видов микоплазм.

Для расчета праймеров был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *E. suis*, имеющихся в базах данных GenBank. На основе результатов сравнительного анализа последовательностей была рассчитана пара праймеров, комплементарных участкам генома, специфичным для данного вида бактерий. Праймеры фланкируют участок размером 180 п.н.

Схема постановки реакции выглядит следующим образом. Из исследуемого образца выделяют суммарную ДНК, используемую впоследствии в реакции амплификации. Продукты ПЦР анализируют в агарозном геле. Наличие фрагмента длиной 180 п.н. свидетельствует о присутствии в пробе *E. suis*.

В ходе оптимизации ПЦР были определены состав реакционной смеси и температурно-временной режим реакции, обеспечивающие максимальную эффективность обнаружения ДНК *E. suis*. Показано, что оптимальными условиями ПЦР являются: количество праймеров — по 5 пМ на реакцию, концентрация MgCl₂ — 3 мМ, отжиг праймеров — при 55°C.

Аналитическая специфичность разработанного метода была проверена на материалах, содержащих различные бактериальные патогены, в том числе микоплазмы: *Eperythrozoon suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharingis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

Для всех проб проводили ПЦР с парой видоспецифичных праймеров. Синтез ампликонов расчетной длины наблюдали только в пробе, содержащей ДНК *E. suis* (рис. 1). В образцах, содержащих другие инфекционные агенты, синтеза каких-либо фрагментов ДНК не наблюдалось, следовательно, исключались перекрестные реакции с гетерологичными видами микоплазм и другими бактериями.

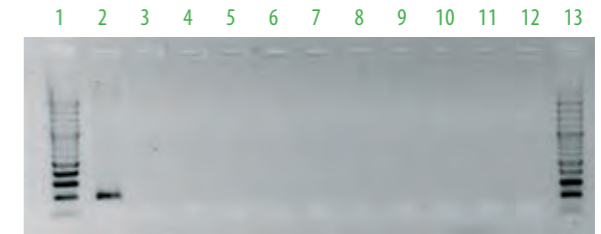


Рис. 1. Результаты проверки аналитической специфичности метода обнаружения ДНК *Eperythrozoon suis*

1, 13 — маркер ДНК;
2 — проба, содержащая *Eperythrozoon suis*;
3 — проба, содержащая *Mycoplasma hyopneumoniae*;
4 — проба, содержащая *Mycoplasma hyorhinis*;
5 — проба, содержащая *Mycoplasma hyosynoviae*;
6 — проба, содержащая *Mycoplasma hyopharingis*;
7 — проба, содержащая *Mycoplasma flocculare*;
8 — проба, содержащая *Mycoplasma bovis*;
9 — проба, содержащая *Mycoplasma ovipneumoniae*;
10 — проба, содержащая *Mannheimia haemolytica*;
11 — проба, содержащая *Pasteurella multocida*;
12 — проба, содержащая *Streptococcus suis*.

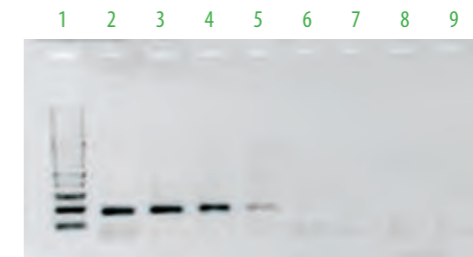


Рис. 2. Результаты проверки аналитической чувствительности метода обнаружения ДНК *Eperythrozoon suis*

1 — маркер ДНК;
2–8 — 10-кратные разведения ДНК *Eperythrozoon suis* от исходного до 1×10⁻⁶;
9 — отрицательный контроль.

Аналитическую чувствительность ПЦР проверяли на серии 10-кратных разведений ДНК *E. suis*. Все пробы исследовались методом ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле. Результаты исследований отражены на рис. 2.

ПЦР позволяла обнаруживать *E. suis* в материале, разведенном в 10³ раз, что не уступает аналитической чувствительности метода традиционной ПЦР, предложенного ранее [5].

Так как при эперитрозоозе характерно длительное носительство возбудителя в организме переболевших и клинически здоровых животных [7], разработанный метод позволяет эффективно контролировать ситуацию по данному заболеванию, выявляя ДНК *E. suis* даже в случае хронического течения инфекции.

Разработанный метод применялся в диагностических исследованиях с 2004 по 2013 гг. (таблица). С его использованием исследовано 119 проб патологического материала, полученных из 9 свиноводческих хозяйств РФ. *E. suis* был обнаружен в 8 образцах (6,7%).

Все положительные результаты были получены при исследовании проб цельной крови с добавлением антикоагулянта, что показывает необходимость корректного отбора проб для проведения достоверной лабораторной диагностики заболевания. Очевидно, что другие материалы для исследования не подходили.

Таблица
Исследования патологического материала
из свиноводческих хозяйств РФ на эперитрозооз

Год	Количество хозяйств, предоставивших пробы	Количество исследованных проб/из них положительно
2004	1	3/0
2005	2	2/0
2008	1	2/0
2009	3	4/0
2010	5	61/7
2011	3	33/1
2012	1	2/0
2013	3	12/0

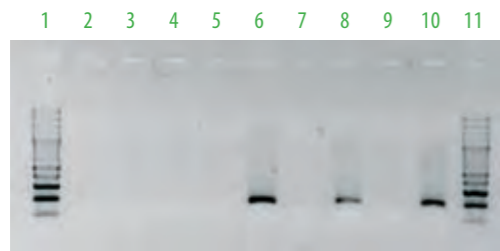


Рис. 3. Результаты исследования проб патологического материала на наличие *Eperythrozoon suis* методом ПЦР
1, 11 — маркер ДНК;
2 — отрицательный контроль;
3 — легкие от ремонтных свинок;
4 — аборт, плоды,
5 — плацента;
6 — кровь от ремонтных свинок;
7 — легкие от поросят-отъемышей;
8 — кровь от свиноматок;
9 — кожа;
10 — положительный контроль.

Эперитрозооз был диагностирован только в двух хозяйствах (в одном хозяйстве из Республики Башкортостан и в одном хозяйстве из Республики Татарстан): ДНК *E. suis* была выявлена в крови у ремонтных свинок с характерными признаками анемии и абортировавших свиноматок. В образцах крови от новорожденных поросят, поросят-сосунов и поросят группы отъема с типичными признаками острой формы эперитрозооза (бледность кожных покровов, цианоз и некроз ушных раковин) возбудитель обнаружен не был (рис. 3).

Обследуемые хозяйства из Башкирии и Татарстана обнаружили новый для себя вид патологии в 2010 г. Этот период совпал по времени с вводом в ремонтное стадо животных из-за рубежа. У свинок наблюдали массовые проявления анемии и аборты.

В заключение можно сказать, что эперитрозооз — новое для российского свиноводства заболевание, и ситуация с его распространением пока мало изучена. Разработанный метод ПЦР является эффективным средством лабораторной диагностики эперитрозооза.

Выводы

1. Разработан метод обнаружения *Eperythrozoon suis*, основанный на ПЦР с электрофоретической детекцией.
2. С использованием разработанного метода в 2004–2013 гг. проведены исследования по выявлению *Eperythrozoon suis*. Возбудитель обнаруживается в пробах цельной крови, отобранных у ремонтных свинок и свиноматок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood / L. E. Hoelzle [et al.] // Vet. Microbiol. — 2003. — Vol. 93. — P. 185–196.
2. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil / A.M. Guimaraes [et al.] // Vet. Rec. — 2007. — Vol. 160, № 2. — P. 50–53.
3. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples / L. E. Hoelzle [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 2007. — Vol. 70. — P. 346–354.
4. Hoelzle L.E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis* // Vet. Microbiol. — 2008. — Vol. 130. — P. 215–226.
5. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma / A. Sokoli [et al.] // Vet. Res. — 2013. — Vol. 44:6 (February). — URL: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/6>.
6. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China / Cong L. Yuan [et al.] // Am. J. Vet. Res. — 2009. — Vol. 70. — P. 890–894.
7. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings / M. Ritzmann [et al.] // Vet. Microbiol. — 2009. — Vol. 133. — P. 84–91.
8. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers / Y. Watanabe [et al.] // J. Vet. Med. Sci. — 2012. — Vol. 74, № 10. — P. 1315–1318.

DEVELOPMENT OF POLIMERAZE CHAIN REACTION BASED TEST SYSTEM FOR EPERYTHROZOON SUIIS DETECTION

M.V. Biryuchenkova¹, A.M. Timina²

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chelysheva@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine) FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: timina@arriah.ru

SUMMARY

A PCR and electrophoresis based tool was developed for *Eperythrozoon suis* detection. During 2004–2013, tests for *Eperythrozoon suis* detection were performed using the developed tool. The agent was detected in whole blood samples collected from replacement gilts and sows.

Key words: *Eperythrozoon suis*, PCR, eperythrozoonosis.

INTRODUCTION

Hematrophic mycoplasmas are an individual cluster of closely related bacteria within *Mycoplasma* genus. Residing on the surface of red blood cells the bacteria damage cellular membranes thus leading to the RBC deformation and destruction, anemia and damage of blood vessel epithelium [5, 7].

As for hematrophic mycoplasmas affecting animals, study relevant is *Eperythrozoon suis* sp. which is an etiologic agent of porcine eperythrozoonosis [3]. Pigs of all ages are susceptible to the agent but the most disease predisposed are fattening pigs in which *Eperythrozoon suis* (*E. suis*) causes short-term hyperthermia, skin pallor and singular cases of jaundice [3, 5]. Clinical signs are highly variable in animals with chronic disease: weaning pigs demonstrate anemia, jaundice, apathy, anorexia; fattening pigs demonstrate stunting and retardation; reproductive function is decreased in sows [3, 4, 5, 7].

The infection caused by *E. suis* is widely spread abroad on the farms practicing intensive pig farming. Animal health monitoring in China demonstrated that 86% of pigs are affected [6]. Prevalence of infected herds in Japan amounts to 7,5% [8]. In Germany 40,3% of tested herds were *E. suis* positive [7]. The agent is present in over 33% of pig herds in Brazil [2]. In addition, the disease is reported in England, Czech Republic, France and Canada.

Economic damage caused by eperythrozoonosis includes reduction of body weight gain and development of secondary infections due to immune deficiency [7].

Such methods as conventional PCR, real time PCR, ELISA, complement fixation test, indirect hemagglutination test are used abroad for laboratory diagnosis of the disease. Histopathological and hematological examinations [1, 3, 4, 5, 6] are also used.

Until recently there has been lack of data on eperythrozoonosis spread in the Russian Federation and this fact has been to some extent dependent on the lack of up-to-date domestic diagnostics.

The work was aimed at development of a tool for *E. suis* detection in pathological material from pigs and the tool application in the laboratory diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Pathological material. Fresh or frozen pieces of internal organs and whole blood from pigs demonstrating signs of anemia, fever and jaundice as well as aborted fetuses from sows with reproductive pathology were used for diagnostic tests.

Bacteria. In order to check the test specificity the following bacteria were used: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma*

hyopharingis, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

Nucleotide sequences: *E. suis* nucleotide sequences deposited in GenBank were used. Nucleotide sequences were analyzed using BioEdit software application.

DNA extraction from 10% suspensions of pathological material samples was performed using 6M guanidinium isothiocyanate and glass fiber filters GF/F.

Polymerase chain reaction. PCR mix included 5 µl of 10× Taq polymerase buffer, 3 mM Mg²⁺, 0.2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA Polymerase, primers (5 pmol each), 5 µl of DNA solution and necessary amount of water to have the final mix volume of 50 µl. PCR was performed on DNA amplifier Mastercycler (Eppendorf, Germany). The program included 35 cycles at the following temperature range: 30 sec denaturation at 94°C; 30 sec annealing of primers at 55°C and 40 sec elongation at 72°C. Reaction products were analyzed using electrophoresis in 2,0% agarose gel containing 0,001% of ethidium bromide at 50 mA.

RESULTS AND DISCUSSION

E. suis genome includes both regions common for different mycoplasma species and species-specific sites. A gene distinguished for its high conservation within species but foreign for other mycoplasma species was selected as PCR target.

Comparative analysis of *E. suis* nucleotide sequences deposited in GenBank was performed for primer calculation. Basing on the results of the comparative analysis of sequences a pair of primers was calculated which were complimentary to genome sites specific for given bacteria species. The primers flank a 180 b.p. site.

The reaction procedure is as follows. Total DNA is extracted from the test sample and it is subsequently used in amplification reaction. PCR products are analyzed in agarose gel. 180 b.p. fragment is indicative of *E. suis* presence in the sample.

During PCR optimization the reaction mix composition and temperature as well as time mode providing for maxi-

mum efficiency of *E. suis* DNA detection were determined. It was demonstrated that optimal PCR conditions are the following: primer quantity – 5 µl of each primer per a reaction; MgCl₂ concentration – 3 mM; primer annealing at 55°C.

Specificity of the developed method was tested using materials containing bacterial pathogens including mycoplasmas: *Eperythrozoon suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharingis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*.

PCR with a pair of species-specific primers was performed for each sample. Synthesis of amplicons of calculated length was reported only in the sample containing *E. suis* DNA (Fig. 1). Samples containing other infectious agents demonstrated no synthesis of any DNA fragments. Thus, cross-reactivity with heterologous mycoplasma species and other bacteria was excluded.

PCR sensitivity was tested on a series of 10-fold dilutions of *E. suis* DNA. All samples were tested using PCR and the results were detected in agarose gel. Fig. 2 shows the test results.

PCR allowed for *E. suis* detection in 10³-fold diluted materials that is comparable with sensitivity of previously proposed conventional PCR [5].

As long carrier state of convalescent and clinically healthy animals is typical in case of eperythrozoonosis [7] the developed method ensures effective control of the disease by detecting *E. suis* DNA even in case of chronic infection.

The developed tool was used for diagnosis from 2004 to 2013 (table) in 199 samples of pathological materials collected in 9 RF pig farms. *E. suis* was detected in 8 samples (6,7%).

All positives were detected during testing whole blood supplemented with anticoagulant thus indicating that correct sampling is a pre-requisite for credible laboratory diagnosis of the disease. Other materials were apparently unsuitable for tests.

Eperythrozoonosis was diagnosed only on two farms (one farm in the Republic of Bashkortostan and one farm in the Republic of Tatarstan): *E suis* DNA was detected in blood of replacement pigs demonstrating typical signs of anemia and in aborting sows. No agent was detected in blood samples collected from newborn piglets, suckling pigs and weaning pigs demonstrating typical signs of acute eperythrozoonosis (skin pallor, cyanosis and necrosis of ear pavilions) (Fig. 3). On the tested farms of Bashkiriya and Tatarstan the novel type of pathology was detected in 2010. This period was synchronous with introduction of animals imported from abroad as the replacement stock. Pigs demonstrated mass anemia and abortions.

In conclusion it may be said that eperythrozoonosis is a novel disease for the RF pig industry and its spread has been underinvestigated yet. The developed PCR tool is an effective method for eperythrozoonosis laboratory diagnosis.

CONCLUSION

1. A PCR and electrophoresis based tool has been developed for *Eperythrozoon suis* detection.

2. Tests for *Eperythrozoon suis* detection were performed in 2004–2013. The agent is detected in whole blood samples collected from replacement pigs and sows.

BIBLIOGRAPHY

1. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood / L. E. Hoelzle [et al.] // *Vet. Microbiol.* — 2003. — Vol. 93. — P. 185–196.

2. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil / A. M. Guimaraes [et al.] // *Vet. Rec.* — 2007. — Vol. 160, № 2. — P. 50–53.

3. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples / L. E. Hoelzle [et al.] // *J. Microbiol. Methods.* — 2007. — Vol. 70. — P. 346–354.

4. Hoelzle L. E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis* // *Vet. Microbiol.* — 2008. — Vol. 130. — P. 215–226.

Table
Testing pathological materials from RF pig farms for eperythrozoonosis

Year	Number of farms submitted the samples	Number of tested samples/ positives
2004	1	3/0
2005	2	2/0
2008	1	2/0
2009	3	4/0
2010	5	61/7
2011	3	33/1
2012	1	2/0
2013	3	12/0

5. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma / A. Sokoli [et al.] // *Vet. Res.* — 2013. — Vol. 44:6 (February). — URL: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/6>.

6. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China / Cong L. Yuan [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* — 2009. — Vol. 70. — P. 890–894.

7. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings / M. Ritzmann [et al.] // *Vet. Microbiol.* — 2009. — Vol. 133. — P. 84–91.

8. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers / Y. Watanabe [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* — 2012. — Vol. 74, № 10. — P. 1315–1318.

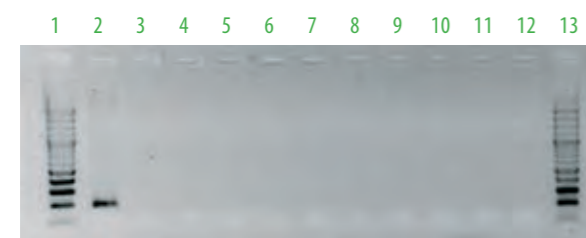


Fig. 1. Specificity test results of the method used for *Eperythrozoon suis* DNA detection

- 1, 13 – DNA marker;
- 2 – a sample containing *Eperythrozoon suis*;
- 3 – a sample containing *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- 4 – a sample containing *Mycoplasma hyorhinis*;
- 5 – a sample containing *Mycoplasma hyosynoviae*;
- 6 – a sample containing *Mycoplasma hyopharingis*;
- 7 – a sample containing *Mycoplasma flocculare*;
- 8 – a sample containing *Mycoplasma bovis*;
- 9 – a sample containing *Mycoplasma ovipneumoniae*;
- 10 – a sample containing *Mannheimia haemolytica*;
- 11 – a sample containing *Pasteurella multocida*;
- 12 – a sample containing *Streptococcus suis*.



Fig. 2. Sensitivity test results of the method used for *Eperythrozoon suis* DNA detection

- 1 – DNA marker;
- 2–8 – 10-fold dilutions of *Eperythrozoon suis* DNA from initial to 1×10⁻⁶;
- 9 – negative control.



Fig. 3. PCR results of pathological material samples tested for *Eperythrozoon suis*

- 1, 11 – DNA marker;
- 2 – negative control;
- 3 – lungs from replacement pigs;
- 4 – aborted fetuses;
- 5 – placenta;
- 6 – blood from replacement pigs;
- 7 – lung of weaning pigs;
- 8 – blood from sows;
- 9 – skin;
- 10 – positive control.

СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА У ПАВЛИНА

А.А. Козлов¹, Н.С. Мудрак², И.А. Чвала³

¹ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: a.mr.seven@mail.ru

² главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Представлены данные лабораторных исследований по обнаружению вируса инфекционного ларинготрахеита в биоматериале павлина и его идентификации. Показан высокий уровень сходства по анализируемому участку генома (99,5%) с вакцинными штаммами «0» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и Serva (Nobilis ILT), которые применяются в промышленном птицеводстве на территории Владимирской области.

Ключевые слова: вирус инфекционного ларинготрахеита, павлин, полимеразная цепная реакция, филогенетический анализ.

UDC 619:616.98:578.825.1:616-076:636.595

DETECTION OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS IN A PEACOCK

A.A. Kozlov¹, N.S. Mudrak², I.A. Chvala³

¹ PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: a.mr.seven@mail.ru

² Leading Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The paper presents data on laboratory tests for infectious laryngotracheitis virus detection in peacock biomaterial and its identification. High level of similarity with vaccine strains «0» (FGBI «ARRIAH») and Serva (Nobilis ILT) used in poultry production in Vladimir oblast in analyzed genome section (99,5%) was demonstrated.

Key words: infectious laryngotracheitis virus, peacock, polymerase chain reaction, phylogenetic analysis.

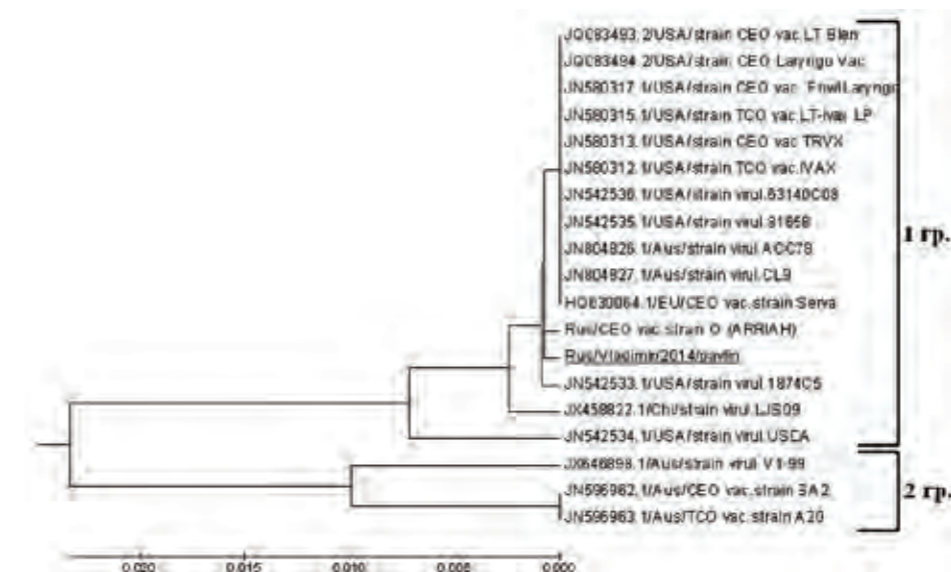
ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ларинготрахеит (ИЛТ) — вирусное высококонтагиозное респираторное заболевание кур, индеек, фазанов и павлинов. Возбудителем является ДНК-содержащий вирус семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Alphaherpesvirinae*, таксономически идентифицируется как *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1). Клиническая и патологоанатомическая картина заболевания наиболее изучена у кур. У инфицированных особей поражения могут быть обнаружены в конъюнктиве и в дыхательных путях, в особенности в гортани и трахее, сопровождаясь повышенным количеством слизи и кровотечением. При лёгкой форме ларинготрахеита клиническими симптомами являются: конъюнктивит, синусит или мукоидный трахеит. При острой форме заболевания в трахее могут наблюдаться сгустки крови или кровь может смешиваться со слизью и отмершими тканями, формируя казеозные образования, приводящие к закупорке трахеального просвета и асфиксии птицы. Острые формы инфекции приводят к высокой заболеваемости (90–100%), уровень смертности составляет от 5 до 70%. Заболеваемость при лёгких формах составляет менее 5%, а уровень смертности очень низок, в пределах 0,1–2% [2]. Клинические признаки и поражения, характерные для ИЛТ у кур, наблюдаются и у других восприимчивых птиц, таких как фазаны и павлины. Случаи инфицирования этих видов птиц, подтверждающие их восприимчивость, описаны крайне редко [5, 7].

Экономический ущерб при данной болезни складывается из потерь в результате гибели большой птицы, вынужденного убоя, снижения яйценоскости и привесов птиц, затрат на мероприятия по ликвидации заболевания [3].

Обнаружение очага инфекции позволяет своевременно провести комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий и минимизировать экономический ущерб, однако установить источник инфекции удаётся не всегда. Актуальным для эпизоотологии остаётся вопрос восприимчивости к ИЛТ различных видов сельскохозяйственных, синантропных и диких птиц.

Рис. Дендрограмма, отражающая филогенетическое сродство штаммов вируса ИЛТ по участку нетранслируемой области гена ICP4



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК из биоматериала павлина (г. Гусь-Хрустальный Владимирской области) проводили с помощью набора «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия).

Для выявления генома вируса ИЛТ проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) согласно методике Callison S.A. и соавторов [6].

Для определения филогенетической принадлежности выявленного вируса ИЛТ проводили амплификацию участка, находящегося в нетранслируемой области гена ICP4, согласно методике [1, 4].

Секвенирование участка ДНК вируса осуществляли с помощью автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). В программе BioEdit были построены выравнивания нуклеотидных последовательностей анализируемого участка относительно геномов штаммов вируса ИЛТ, представленных в базе данных GenBank. С помощью программы MEGA 3.1, алгоритм построения UPGMA, были получены дендрограммы, отражающие генетическое сродство анализируемых последовательностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В феврале 2014 г. в референтную лабораторию вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» поступил труп погибшего павлина из частного сектора г. Гусь-Хрустальный Владимирской области.

В результате патологоанатомического исследования были обнаружены кровоизлияния в гортани и трахее с наличием плотных сгустков экссудата с кровью. Гибель павлина, предположительно, произошла вследствие асфиксии.

В результате анализа методом ПЦР-РВ в патологическом материале был выявлен геном вируса ИЛТ. Проверка данным методом на контаминацию показала отсутствие геномов других вирусных агентов, вызывающих респираторный симптомокомплекс у птиц, а также микоплазмы. Выделить вирус методом культивирования в эмбрионах СПФ-кур не удалось.

Случаи инфицирования павлинов были описаны ранее. Так, Винтефилд и Соу описали выделение вируса ИЛТ из трахеи павлина в 1968 г. [7]. Крошо и Бойкот описали случай гибели фазанов и павлинов от ИЛТ

и развитие клинических признаков, характерных для данного заболевания, у других птиц в зоологическом саду в Виннипеге, Канада (1982 г.) [5]. У погибших павлинов, как и у фазанов, было обнаружено утолщение слизистой оболочки трахеи и наличие толстых экссудативных пробок в нижней части трахеи и бронхах. Клинически у павлинов и фазанов наблюдали угнетённое состояние, конъюнктивит, синусит, носовые истечения и затруднённое дыхание. Патогенных бактерий у павших птиц обнаружено не было [5].

По результатам филогенетического анализа фрагмента нетранслируемой области гена ICP4 (рисунок) был сделан вывод, что выявленный у павлина вирус ИЛТ входит в первую филогенетическую группу, в которую включены основные вакцинные штаммы Cover (CEO вакцина LaryngoVac), Hadson (CEO вакцины TRVX и LT Blen), Serva (Nobilis ILT), производство США и Европы. Отечественный вакцинный штамм «О» ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ILTV/Rus/CEO vac. strain O (ARRIAH)) также входит в данную группу.

Уровень нуклеотидного сходства с вакцинными штаммами «О» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и Serva (Nobilis ILT), применяющимися на территории Владимирской области, составил 99,5%. Нуклеотидное сходство по данному участку между указанными филогенетическими группами (рисунок) в среднем составляет 93,7%.

Как показывают ранее проведённые исследования, изоляты вируса ИЛТ, входящие в первую филогенетическую группу, имеют наибольшее распространение на территории РФ. Анализ нуклеотидной последовательности использованного участка генома не позволяет провести более глубокую дифференциацию выявленного вируса. В связи с большой длиной генома вируса ИЛТ и высокой степенью его консервативности наиболее детальный филогенетический анализ возможен при использовании нуклеотидной последовательности всего генома вируса. В данном случае это весьма затруднено из-за отрицательных результатов культивирования вируса в эмбрионах СПФ-кур, так как для технологии пиросеквенирования на этапе пробоподготовки необходим вирусный материал с высоким титром.

Обнаружение вируса ИЛТ в биоматериале павлина подтверждает возможность инфицирования не только сельскохозяйственных птиц. Особенно это касается частных подворий, где совместное содержание различных видов домашней птицы повышает возможность горизонтальной передачи вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования в патологическом материале от погибшего павлина был выявлен геном вируса ИЛТ. При вскрытии у павлина были обнаружены поражения, характерные для данного заболевания. Других вирусных агентов, вызывающих респираторный симптомокомплекс у птиц, а также микоплазмы в исследуемом материале обнаружено не было.

В результате филогенетического анализа фрагмента нетранслируемой области гена ICP4 было установлено родство выявленного вируса с представителями первой филогенетической группы, наиболее распространённой на территории РФ.

Показан высокий уровень сходства по анализируемому участку генома (99,5%) с вакцинными штаммами «О» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и Serva (Nobilis ILT), которые применяются в промышленном птицеводстве на территории Владимирской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батченко Г.В. Выделение, идентификация и характеристика изолятов вирусов инфекционного бронхита кур и инфекционного ларинготрахеита птиц: дис. ... канд. биол. наук. — Владимир, 2004. — 156 с.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц: пер. с англ. / под. ред. Б.У. Кэлнека [и др.]. — М.: Аквариумбук, 2003. — С. 608–622.
3. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / под. ред. Д.К. Львова. — М.: Медицинское информационное агентство, 2013. — С. 1073–1076.
4. Кулаков В.Ю., Батченко Г.В., Борисов А.В. Методические рекомендации по выделению, типированию и идентификации вируса инфекционного ларинготрахеита птиц. — Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2001. — 10 с.
5. Crawshaw G.J., Boycott B.R. Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants // Avian Diseases. — 1982. — Vol. 26. — P. 397–401.
6. Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry / S.A. Callison, S.M. Riblet, I. Oldoni [et al.] // J. Virol. Meth. — 2007. — Vol. 139. — P. 31–38.
7. Winter-field R.W., So I.G. Susceptibility of turkeys to infectious laryngotracheitis // Avian Diseases. — 1968. — Vol. 12. — P. 191–202.

УДК 619:616.98:579.843.95

РАЗЛИЧИЕ КОНТРОЛЯ НАД ЭПИЗОТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ ПАСТЕРЕЛЛЁЗА И ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ СЕПТИЦЕМИИ

С.И. Джупина

доктор ветеринарных наук, профессор,
Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва, e-mail: dzhupina@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Показано, что функцию этиологического фактора пастереллёза и геморрагической септицемии выполняют различные серологические варианты бактерии *Pasteurella multocida*. Для них характерно различие резервуаров и источников, путей и механизмов передачи возбудителя инфекции, что формирует эпизоотические процессы различных экологических категорий. Соответственно контроль над эпизоотическим процессом пастереллёза реализуется удовлетворением запросов животных от условий внешней среды (сухая подстилка, удовлетворительный воздухообмен, прогулки и др.), а над эпизоотическим процессом геморрагической септицемии — вакцинацией продуктивных животных по эпизоотологическим показаниям и использованием репеллентов и инсектицидов.

Ключевые слова: серологические варианты *Pasteurella multocida*, пастереллёз, геморрагическая септицемия.

UDC 619:616.98:579.843.95

DIFFERENT TYPES OF CONTROL OVER EPIDEMIC PROCESSES OF PASTEURELLOSIS AND HAEMORRHAGIC SEPTICEMIA

S.I. Dzhupina

Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor,
Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow, e-mail: dzhupina@yandex.ru

SUMMARY

It was shown that different serological variants of *Pasteurella multocida* bacteria accomplish a function of an etiological factor of pasteurellosis and haemorrhagic septicemia. They are characterized by different reservoirs and sources, routes and mechanisms of infectious agent transmission and it gives rise to epidemic processes of different ecological categories. Correspondingly, the control over pasteurellosis epidemic process is realized by satisfaction of animal needs by environmental conditions (dry bedding, satisfactory air exchange, time in the open air, etc.) and the control over haemorrhagic septicemia epidemic process is realized by vaccination of production animals according to epizootological showings and use of repellents and insecticides.

Key words: *Pasteurella multocida* serological variants, pasteurellosis, haemorrhagic septicemia



Рациональная эпизоотологическая классификация рассматривает инфекционные болезни продуктивных животных как факторные и классические. Эпизоотическим процессам одних из таких болезней свойственна эстафетная передача возбудителя инфекции, а другим такая передача не свойственна. Эпизоотические процессы болезней этих экологических категорий и эпизоотологических групп существенно различаются по резервуарам и источникам, путям и механизмам передачи возбудителя инфекции и другим его компонентам. Они управляются специфическими законами эпизоотического процесса [2]. Такое различие убедительно просматривается на эпизоотических процессах пастереллёза и геморрагической септицемии продуктивных животных.

Известно, что инфекционная болезнь продуктивных животных, этиологическим фактором которой является *P. multocida* и *P. hemolytica*, проявляется сверхостро, остро, хронически и латентно. До последнего времени эту болезнь рассматривают как единую нозологическую форму — пастереллёз. Хотя многие авторы [3, 7] сверхострое и острое её проявление определяли как геморрагическая септицемия. Такое определение болезни только на основе клинического проявления было малоубедительным и не нашло широкого применения.

Но необходимость рассматривать пастереллёз и геморрагическую септицемию как самостоятельные нозологические формы подтверждается их принадлежностью к различным экологическим категориям. У возбудителей этих инфекционных болезней различные облигатные хозяева. Соответственно, различаются условия закономерной жизни возбудителей в организме животных разных видов и порождаемые ими

пусковые механизмы и движущие силы, особенности проявления и контроля над эпизоотическими процессами пастереллёза и геморрагической септицемии.

В настоящее время известно, что бактерия *P. multocida* объединяет четыре серологических варианта, облигатными хозяевами которых являются животные разных видов [9–11]. Функцию облигатного хозяина *P. multocida* серологических вариантов А и D выполняют животные. Эти бактерии закономерно живут, и их выделяют из слизистой оболочки верхних дыхательных путей преимущественно молодых продуктивных животных [8]. При удовлетворительных условиях содержания и нормальном состоянии здоровья животных эти серологические варианты пастерелл остаются неболезнетворными, а их хозяева — скрытыми носителями возбудителя инфекции. Есть основание полагать, что они закономерно живут в организме своих облигатных хозяев в L-форме и передаются потомству вертикальным путём.

Изменение условий жизни пастерелл серологических вариантов А и D на слизистой оболочке верхних дыхательных путей трансформирует их в болезнетворную форму. Такие изменения происходят при стрессовых воздействиях на животных. Надо полагать, что эти воздействия превращают L-форму пастерелл в болезнетворную S-форму, являющуюся причиной клинического проявления болезни с характерным поражением респираторных органов. У животных повышается температура тела, они отказываются от корма, предпочитают лежать без движений. Зачастую болезнь завершается летальным исходом.

Соответственно, функцию пускового механизма проявления эпизоотического процесса инфекционной болезни, этиологическим фактором которой яв-

ляются пастереллы серологических вариантов А и D, выполняет изменение условий жизни этих бактерий в организме своего облигатного хозяина. Такие условия изменяются при воздействии на организм животных различных неблагоприятных факторов внешней среды.

Чаще других такими факторами, задействующими пусковой механизм проявления эпизоотического процесса этой факторной инфекционной болезни, становится сырой и промозглый микроклимат в помещении, где содержат животных, влажный холодный пол и отсутствие сухой соломенной подстилки. Летом таким фактором является отсутствие теневых укрытий для содержания животных в дни повышенного солнечного излучения или при ненастных погодных условиях.

Весьма часто фактором, задействующим пусковой механизм эпизоотического процесса этой инфекционной болезни, становится повышение температуры тела продуктивных животных, вызванное различными вирусными инфекционными болезнями. В такой ситуации болезнь определяют как ассоциированную. Могут быть и другие стрессовые воздействия на животных, которые изменяют условия скрытой естественной жизни возбудителя этой болезни в организме его облигатного хозяина.

Такое понимание причин появления и распространения болезни является основанием для отнесения её к категории факторных инфекционных болезней, эпизоотическому процессу которых не свойственна эстафетная передача возбудителя инфекции. Управляется эпизоотический процесс этой инфекционной болезни законом стресса [1]. Оправданно болезнь, этиологическим фактором которой является *P. multocida* серологических вариантов А и D, определять как пастереллёз.

Крупный рогатый скот болеет пастереллёзом в возрасте 4–9 месяцев, реже — в старшем возрасте. Ягнята чаще всего болеют в возрасте 3–7 месяцев, поросята — вскоре после отъёма, реже — в старшем возрасте. Клинически болезнь протекает подостро или хронически, с повышением температуры тела до 40–40,5 °С, отказом от корма и от движений. Для неё характерны поражения респираторной системы с охватом легочной ткани, низкие приросты живой массы, отставание в росте и развитии.

Заболевание продуктивных животных пастереллёзом чаще проявляется в осенние и ненастные летние дни, в переходный период с летне-пастбищного содержания на зимне-стойловое и наоборот. В зимний период болезнь проявляется при неудовлетворительных условиях содержания животных.

Проявлению эпизоотического процесса пастереллёза свойственны хлевной характер заболевания, отсутствие случаев эстафетной передачи возбудителя инфекции не только с фермы на ферму, но и от больных к здоровым животным в пределах одной фермы, увеличение числа погибших животных, если не улучшить санитарные и гигиенические условия содержания. Заболевают только те животные, которые подвергнуты стрессовым воздействиям неблагоприятных факторов внешней среды.

Лечат заболевших животных применением сульфаниламидных препаратов, антибиотиков: тетрациклин, стрептомицин, дибациллин и др. Но если не обеспечивать запрос организма от условий внешней среды (сухая подстилка, вентиляция, устранение влажности), то лечение не эффективно.

Таким образом, основным фактором, запускающим пусковой механизм проявления эпизоотического процесса пастереллёза, являются неудовлетворительные условия содержания животных или несоблюдение требований их организма от условий внешней среды. Заболевают многие животные, но не по причине передачи возбудителя инфекции к ним от больных, как на то ориентирует принятое определение эпизоотического процесса, а в результате однозначного стрессового воздействия неблагоприятных факторов внешней среды на всех животных соответствующей группы.

Хотя возбудитель пастереллёза и несёт на себе признаки генетической чужеродности, но крупный рогатый скот и продуктивные животные других видов, в ходе совместной с ним эволюции, адаптировались и проявляют терпимость к такой его жизнедеятельности в их организме на слизистой оболочке верхних дыхательных путей.

В такой ситуации центральный биологический механизм иммунитета затрудняется отделить «чужое» от «своего». Поэтому слабо развиваются специфические иммунобиологические реакции и контролирующая сила иммунного ответа. Совместная эволюция возбудителя инфекции и его облигатного хозяина затруднила способность вызывать образование антител. Иммунный ответ есть, но его сила подавлена силой совместной эволюции возбудителя инфекции и его облигатного хозяина.

Этим объясняется то, что вакцины для профилактики пастереллёза и других инфекционных болезней животных — облигатных хозяев соответствующего возбудителя инфекции — неэффективны или слабоэффективны.

Такой вывод подтверждается их практическим использованием. Основным недостатком вакцин, предназначенных для защиты животных от пастереллёза, является то, что они не оказывают влияния на жизнь его возбудителя в организме облигатного хозяина.

Соответственно, меры контроля над проявлением эпизоотического процесса этой инфекционной болезни продуктивных животных заключаются в том, чтобы не провоцировать скрытое носительство его возбудителя. Такое требование соблюдается в том случае, когда для продуктивных животных создаются оптимально комфортные условия содержания и кормления. Они заключаются в обеспечении животных такими условиями, какие их организм запрашивает от внешней среды. Прежде всего помещения для содержания животных должны быть сухими и комфортными. Образцом для понимания этого запроса может служить место отдыха диких парнокопытных, какое они создают для себя в зимний период в условиях степи или лесных угодий. При любых погодных ненастьях дикие парнокопытные животные в таких местах надёжно сохраняют здоровье.

Применительно к сельскохозяйственным продуктивным животным это значит, что для обеспечения их подстилкой надо заготавливать и хранить в соответствующих условиях достаточное количество соломы и регулярно использовать её для их комфортного содержания.

Доказано, что у животного, лежащего на полу без подстилки, теплообмен теплопроводностью более чем в 200 раз выше теплообмена при наличии подстилки. А теплообмен конвекцией и излучением даже в помещениях, где поддерживается температура 8 °С, почти в 100 раз выше, чем на обильной сухой соломенной подстилке [6].

По нашим многолетним наблюдениям обеспечение животных подстилкой является такой же мерой профилактики пастереллёза, как предупреждение появления вспышек и распространения сибирской язвы с помощью вакцин. Не менее важно решить проблему канализации с таким расчетом, чтобы экскременты животных не перетаскивались круглосуточно по территории помещения. Не надо забывать, что парнокопытные — это животные жвачные, четырехкамерный желудок которых требует ежедневно большого объёма грубых кормов, и недопустимо их заменять концентратами и кислыми кормами. Эти корма можно использовать только как подкормку. А балансирование рациона надо обеспечивать за счет использования бобовых трав (люцерна и др.).

Разумеется, очень важно поддерживать в помещении хороший воздухообмен и не допускать повышенного увлажнения подстилки и мест содержания животных. Контроль над предупреждением повышенной сырости и своевременная замена увлажнённой подстилки всегда защищают продуктивных животных от факторных инфекционных болезней, эпизоотическому процессу которых несвойственна эстафетная передача возбудителя инфекции.

Такая профилактика предупреждает случаи заболевания продуктивных животных не только пастереллёзом, но и маститами, эндометритами и многими другими факторными инфекционными болезнями. Она обеспечивает высокие санитарные и гигиенические показатели условий содержания животных и производство полноценных и безопасных в ветеринарном отношении продуктов животного происхождения. Выполнение требований такой профилактики способствует нормальному плодonoшению самок и их многолетней эксплуатации.

Заболевание продуктивных животных пастереллёзом является красноречивым показателем крайне неудовлетворительных условий их содержания.

Облигатными хозяевами этой же бактерии *P. multocida*, но серологического варианта В, являются грызуны и землеройки [4]. Известно, что на Африканском континенте грызуны выполняют функцию облигатного хозяина пастереллы серологического варианта Е, которая является этиологическим фактором остро протекающей инфекционной болезни животных, аналогичной болезни, причиной которой является пастерелла серологического варианта В. Эти серологические варианты пастерелл в органах и тканях грызунов — их облигатных хозяев — остаются авирулентными.

Но они выполняют функцию пускового механизма эпизоотического процесса остро протекающей инфекционной болезни после проникновения в органы и ткани животных — потенциальных хозяев. Этими хозяевами являются продуктивные животные. Такое проникновение от облигатного хозяина рассценивается как первичное. Его первичный механизм реализуется трансмиссивной передачей возбудителя инфекции кровососами — клещами. Вскоре после первичного инфицирования потенциальные хозяева становятся вторичными источниками возбудителя инфекции, в популяциях которых создаются условия для вторичных механизмов его передачи. Функцию таких механизмов выполняют слепни и другие летающие кровососы.

Как и при пастереллёзе, причиной клинического проявления такой инфекционной болезни становится

изменение естественных условий жизнедеятельности возбудителя инфекции. Но такое изменение происходит не в результате стрессового воздействия на облигатного хозяина, как при пастереллёзе, а в результате отличия среды, в которую проникла пастерелла серовара В, — в органы и ткани потенциального хозяина из места её естественной жизнедеятельности в организме облигатного хозяина. После проникновения в организм потенциального хозяина пастерелла серовара В попадает в несвойственную для неё среду жизнедеятельности, что трансформирует её из авирулентной L-формы в вирулентную S-форму.

Эпизоотический процесс инфекционной болезни, этиологическим фактором которой является *P. multocida* серовара В, всегда формирует только горизонтальный путь передачи возбудителя инфекции, и эта болезнь проявляется характерными клиническими признаками. Эти особенности стали основанием для отнесения её к экологической категории классических инфекционных болезней, эпизоотическому процессу которых свойственна эстафетная передача возбудителя инфекции. Управляется эпизоотический процесс этой инфекционной болезни законом потенциальности. В отличие от пастереллёза, болезнь, причиной которой является *P. multocida* серологического варианта В, уместно называть геморрагической септицемией.

Геморрагическая септицемия характеризуется острым и сверхострым проявлением инфекционного процесса. Болеют преимущественно взрослые сельскохозяйственные и дикие парнокопытные животные. Температура тела у заболевших животных поднимается выше 42 °С. Летальный исход этой болезни наступает на 2–3 сутки.

Эпизоотическое распространение геморрагической септицемии проявляется преимущественно в засушливые летние месяцы, которым свойственна повышенная численность летающих кровососов. Чаще болеют животные в условиях пастбищного содержания в местах, определяемых как природные очаги скрытого носительства *P. multocida* серовара В в популяциях грызунов и землероек.

В Новосибирской области такие эпизоотии имели место в 1974 году, когда с 7 по 19 июля в шести районах северо-западной части области более чем в 50 очагах заболело около 1500 голов крупного рогатого скота, третья часть из числа которых — с летальным исходом. Выделение больных сократилось после обильного грозового ливня, резко снизившего интенсивность лёта летающих кровососов. В 1981 году с 23 июня по 8 июля эпизоотическое распространение геморрагической септицемии охватило 5 животноводческих хозяйств одного из районов северо-восточной части области, где заболело 195 и пало 95 дойных коров.

По данным Nordkvist M. och Karlsson K.-A. [12], в Швеции в июле и августе 1912, 1913 и 1924 года при сухой и жаркой погоде наблюдали массовую заболеваемость северных оленей, при которой смертность доходила до 50%. Лабораторными исследованиями от трупов выделяли *P. multocida*. В 1959 году при таких же климатических характеристиках в северных регионах страны от этой болезни погибло до 70% северных оленей. Авторы обращают внимание на то, что при бактериологическом исследовании проявлялся обильный рост *P. multocida*. Они признают, что фактором, способствующим массовой заболеваемости северных оленей, была сухая и жаркая погода, но, по их заклю-

чению, оставалось непонятно, каким образом она снижала жизнеспособность животных. Такое понимание причины появления и распространения болезни объясняется тем, что авторы воспринимали её как факторную инфекционную болезнь и не учитывали, что пастерелла может быть причиной классической болезни.

Ветеринарные лаборатории до последнего времени не проводили типизации серологических вариантов пастерелл. Но, судя по описаниям особенностей проявления эпизоотического процесса и клиническим характеристикам болезни, есть основание полагать, что её вспышки среди крупного рогатого скота, свиней и животных некоторых других видов встречаются довольно часто, особенно в летний период. Эпизоотии геморрагической септицемии поражают животных периодически, преимущественно в засушливые годы, для которых характерно увеличение численности пастбищных клещей и летающих кровососов.

Заболевание животных геморрагической септицемией является характерным образцом, наряду с сибирской язвой, классической инфекционной болезни сельскохозяйственных животных.

Весьма эффективно своевременное лечение больных этой болезнью специфической сывороткой, антибиотиками и сульфаниламидными препаратами.

Поскольку *P. multocida* серологического варианта В закономерно не живёт в организме восприимчивых парнокопытных животных, а проникает к ним извне от грызунов и землероек, то их центральный биологический механизм иммунитета легко распознаёт генетическую чужеродность бактерии и обеспечивает развитие специфических иммунологических реакций [5].

Сконструированная из *P. multocida* серологического варианта В вакцина против геморрагической септи-

цемии надёжно предупреждает вспышки этой инфекционной болезни и обрывает её распространение на 2–3 день после прививок. Вакциной прививают в начале пастбищного периода. Учитывая, что геморрагическая септицемия регистрируется только в отдельные годы, допустимо проводить прививки животным только в годы регистрации болезни. В этом случае ветеринарный врач должен постоянно помнить об условиях, способствующих её появлению и распространению, и при первом случае заболевания интенсивно лечить больное животное и проводить прививки всему поголовью. Для профилактики этой инфекционной болезни оправданны многократные обработки продуктивных животных и мест их содержания репеллентами и инсектицидами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из представленного материала видно, что хотя возбудители пастереллёза и геморрагической септицемии относятся к общему виду *P. multocida*, но порождаемые различными серологическими вариантами этой бактерии клинические проявления болезни и эпизоотические процессы существенно различаются.

Формирование эпизоотических процессов этих болезней определяется изменением условий жизни серологических вариантов бактерии *P. multocida*, что наглядно иллюстрирует неоднозначность компонентов этих процессов факторных и классических инфекционных болезней. Соответственно различаются резервуары и источники возбудителя инфекции, пути и механизмы его передачи, пусковые механизмы и движущие силы их эпизоотических процессов. Принципиально различны проявления эпизоотиче-



ских процессов этих инфекционных болезней и меры контроля над ними.

Первичный источник и первичный механизм передачи возбудителя инфекции при всех инфекционных болезнях формирует его облигатный хозяин. А за потенциальным хозяином сохраняется вторичность этих компонентов эпизоотического процесса.

Клиническое проявление инфекционных болезней обусловлено изменением условий для жизни их возбудителей. При классических инфекционных болезнях такое изменение происходит, когда возбудитель инфекции проникает от облигатного к потенциальному хозяину, в организме которого условия для его жизни отличаются от условий в организме облигатного хозяина. Эта же причина порождает клиническое проявление факторных инфекционных болезней, когда условия жизни возбудителя инфекции меняются в результате стрессовых воздействий на облигатного хозяина.

Становится возможным целенаправленно, научно обоснованно дифференцировать контроль над эпизоотическими процессами факторных и классических инфекционных болезней.

Различие инфекционного и эпизоотического процессов пастереллёза и геморрагической септицемии продуктивных животных обусловлено, прежде всего, различием экологических категорий, к которым эти болезни относятся, и, соответственно, неоднозначной природой пусковых механизмов и движущих сил их эпизоотических процессов.

Учитывая столь значительное различие роли серологических вариантов *P. multocida* в формировании эпизоотических процессов пастереллёза и геморрагической септицемии и мер контроля над их проявлением, в случае выделения пастерелл из патологического материала при бактериологическом исследовании целесообразно определять их серологические варианты и о результатах оперативно информировать ветеринарных врачей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джупина С.И. Теория эпизоотического процесса. — М.: ООО «Ветеринарный консультант», 2004. — 124 с.
2. Джупина С.И. Законы эпизоотического процесса: монография. — Germany, Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2013. — 104 с.
3. Душук Р.В. Болезни, вызываемые пастереллами. Пастереллёзы // Инфекционные болезни животных: справочник / под ред. Д.Ф. Осидзе. — М.: Агропромиздат, 1987. — С. 188–195.
4. Колосов А.А. Эпизоотология и профилактика пастереллёзов сельскохозяйственных животных в Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Новосибирск, 1989. — 22 с.
5. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1983. — 368 с.
6. Протопопов А.П. Значение подстилки в теплообмене молодняка сельскохозяйственных животных // Вестник сельскохозяйственной науки. — 1959. — № 12. — С. 48–58.
7. Фомина А.Я. Пастереллёз (геморрагическая септицемия) // Инфекционные и инвазионные болезни КРС. — М.: Госиздат с.-х. литературы, 1956. — С. 137–144.
8. Шегидевич Э.А. Состояние и перспективы изучения пастереллёзов сельскохозяйственных животных // Труды ВИЭВ. — 1984. — Т. 60. — С. 58–63.
9. Jordache A., Ungureanu C. Identificarea tipurilor serologice la *Pasteurella multocida* si *Pasteurella haemolytica* isolate de la tineretul teurin din focare de bronchopneumonia // Rev. Zootehn. Med. Veter. — 1973. — № 23. — P. 37–41.
10. Murata M., Horinehi T., Namioka S. Studies on the pathogenicity of *Pasteurella multocida* for mice and chickens on the basis of O groups // Cornell. Vet. — 1964. — Vol. 54. — P. 293–307.
11. Namioka S., Bruner S. W. Serological studies on *Pasteurella multocida* IV type distribution of the organisms on the basis of their capsule and O groups // Cornell. Vet. — 1963. — Vol. 53. — P. 41–53.
12. Nordkvist M. och Karlsson K.-A. Epizootiskt förlöpande infektion med *Pasteurella multocida* hos ren // Nord. Vet. Med. — 1962. — Vol. 14. — P. 1–15.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

Редакция «Ветеринарии сегодня» рассмотрит возможность для публикации Ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – представление 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 публикуем 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. Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.

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.

*Предоставление в редакцию рукописи статей является подтверждением согласия автора на использование его произведения, как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник.

СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. УДК;
2. Название статьи;
3. Имя, отчество, фамилия автора;
4. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты;
5. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающие фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300-500 знаков с пробелами);
6. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи;

7. Введение;
8. Материалы и методы;
9. Результаты и обсуждения;
10. Выводы и заключение;
11. Список литературы (т.е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008. Не более 5-7 источников;
12. 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 .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно);
13. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии/руководителя, заверенные круглой печатью учреждения.

*В таком же порядке и с такой же структурой предоставляется англоязычный перевод статьи.

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, 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.

Оригиналы и копии присланных статей не возвращаются. Авторы должны гарантировать, что поданный материал не был ранее опубликован. Важным условием для принятия статей в журнал «Ветеринария сегодня» является выполнение всех вышеперечисленных требований редакции.

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

С 1 сентября 2014 года открыта подписка на журнал «Ветеринария сегодня» в каталоге «Газеты. Журналы» ОАО Агентство «Роспечать» на первое и второе полугодие 2015 года. Подписной индекс издания 70460, стоимость подписки на полугодие (два номера журнала) 1520 руб. 00 коп. Подписаться на журнал можно в любом отделении «Почты России».

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)

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: mail@arriah.ru; <http://www.arriah.ru>