

ISSN 2304-196X

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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

МАЙ №2 {13} 2015



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

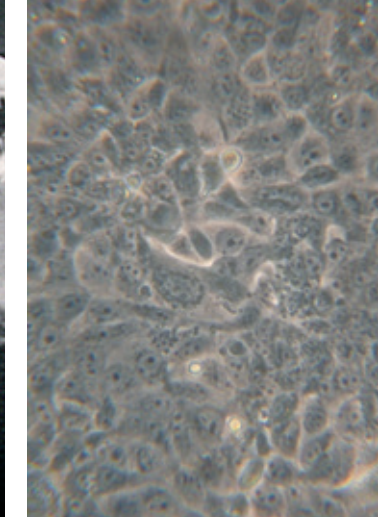
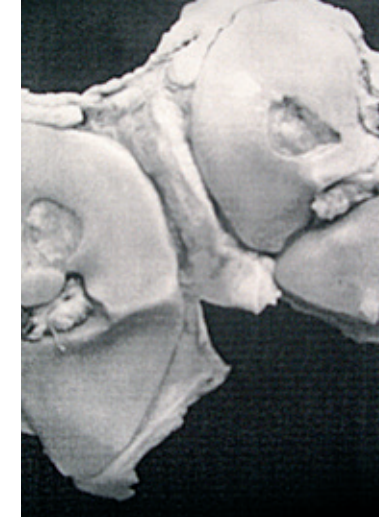
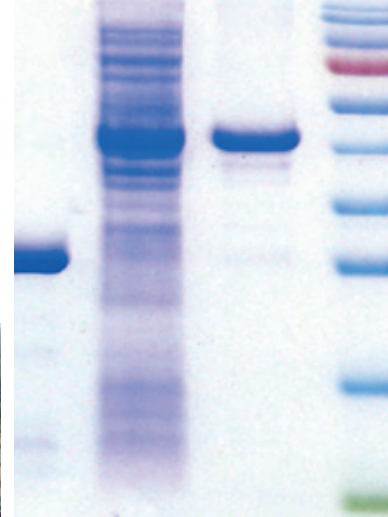


Ведущий центр разработчиков и производителей ветеринарных препаратов для профилактики и диагностики болезней птиц, свиней и рогатого скота (производится более 100 наименований вакцин и около 50 наименований диагностических наборов).

- 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 №2 (13) 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: Юлия Мелано

Выпускающие редакторы: Ольга Борисова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова
e-mail: veterinarytoday@yandex.ru, тел.: +7 915 477 78 36
borisova@arriah.ru; 8 (4922) 26 15 12, доп. 25-00

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 12 мая 2015 года

СОДЕРЖАНИЕ

- 8** Д.А. Лозовой, А.М. Рахманов
Сотрудничество ветеринарных служб государств — участников СНГ
- 11** С.И. Данильченко, Е.С. Кузина, И.В. Бородкина
Деятельность филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым
- 14** А.М. Рахманов, Б.А. Глушко
Военное поколение сотрудников Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института — ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (к 70-летию Победы в Великой Отечественной войне)
- 17** С.В. Кононова, А.А. Нестеров, В.В. Думова, Б.Л. Манин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, О.Г. Губенко
Адаптация вируса болезни шмалленберга к перевиваемым клеточным культурам
- 21** С.И. Джупина
Особенности профилактики некробактериоза крупного рогатого скота
- 27** А.В. Щербаков, А.С. Яковлева, А.М. Тимина, М.Р. Якупов
Клонирование и экспрессия в E. COLI генов K205R и B602L вируса африканской чумы свиней
- 35** А.А. Передача, С.В. Фролов, Д.Л. Долгов, М.А. Волкова, Д.А. Глейзер
Изучение иммунобиологических свойств вакцины против аденовирусной инфекции, изготовленной на основе аденовируса птиц 2 серотипа
- 37** М.А. Волкова, Ир.А. Чвала
Идентификация Т- и В-лимфоцитов кур и их субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии с использованием проточного цитометра BD FACSVerser™
- 48** М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков
Реакция агглютинации латекса для быстрого выявления антител к вирусу инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых рыб
- 54** Д.К. Павлов, А.А. Пичуева
Анализ эпизоотической ситуации в мире по вирусным болезням рыб

CONTENTS

- 8** D.A. Lozovoy, A.M. Rakhmanov
Collaboration between veterinary services of cis countries
- 11** S.I. Danilchenko, Ye.S. Kuzina, I.V. Borodkina
Activities of the FGBI “ARRIAH” branch in the Republic of Crimea
- 14** A.M. Rakhmanov, B.A. Glushko
War generation of personnel working in the all Russian FMD research institute, FGBI «Federal centre for animal health» (devoted to 70th Anniversary of the Great Patriotic War)
- 17** S.V. Kononova, A.A. Nesterov, V.V. Dumova, B.L. Manin, A.V. Kononov, Yu.Yu. Babin, O.G. Gubenko
Adaptation of schmallenberg virus to continuous cell cultures
- 21** S.I. Dzhupina
Special aspects of bovine necrobacillosis prevention
- 31** A.V. Scherbakov, A.S. Yakovleva, A.M. Timina, M.R. Yakupov
Cloning and expression of African swine fever virus K205R and B602L genes in E. COLI
- 35** A.A. Perepecha, S.V. Frolov, D.L. Dolgov, M.A. Volkova, D.A. Gleyzer
Study of immunobiological properties of avian adenovirus serotype 2 – based vaccine against adenovirus infection
- 43** M.A. Volkova, Ir.A. Chvala
Identification of T and B lymphocytes in chickens and their subpopulations by flow cytometric analysis using flow cytometer BD FACSVerser™
- 48** M.I. Doronin, V.A. Pylnov, S.S. Rybakov
Latex agglutination test for rapid detection of antibodies to infectious hematopoietic necrosis virus of salmon
- 54** D.K. Pavlov, A.A. Pichuyeva
Analysis of fish viral disease epidemic situation worldwide



Рыбаков Сергей Сергеевич
(15.01.1942–26.02.2015)

26 февраля 2015 г. после продолжительной болезни ушел из жизни Рыбаков Сергей Сергеевич — доктор биологических наук, профессор, видный ученый в области ветеринарной вирусологии и молекулярной биологии, начальник научно-образовательного отдела, один из ветеранов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Сергей Сергеевич Рыбаков родился на суздальской земле в селе Федоровское Владимирской области в многодетной крестьянской семье.

Детство его прошло в трудные военные и послевоенные годы без отца, который погиб на фронте в первые месяцы войны. После учебы в Туртинской семилетней школе Суздальского района он поступает в 1956 г. на ветеринарное отделение во Владимирский сельскохозяйственный техникум, после окончания которого в 1960 г. становится студентом факультета естествознания Удмуртского пединститута (г. Ижевск). Закончив его в 1964 г., в течение 2-х лет работает учителем химии и биологии в школе рабочей молодежи в г. Горьком и продолжает учебу на биофаке в Горьковском университете. После его окончания по рекомендации ученого совета поступает в аспирантуру в лабораторию биохимии Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института, с которым в дальнейшем будет связана вся его деятельность. В 1970 г. он успешно защитил кандидатскую диссертацию. В 1969–1971 гг. работал младшим научным сотрудником лаборатории биохимии, в 1971–1979 гг. старшим научным сотрудником лаборатории генетики. В 1979 г. был избран на должность заведующего этой лабораторией, а с 1991 г. одновременно являлся заведующим отделом молекулярной биологии ВНИИИ. В 1995 г. был избран

на должность заведующего отделом иммунопатологии животных и заведующего лабораторией физико-химических исследований, а в 1997 г. заведующего лабораторией малоизученных болезней, которой руководил в течение 10 лет. В 2007 г. под руководством С.С. Рыбакова был создан отдел малоизученных болезней, включающий три лаборатории: мониторинга бешенства, прионных болезней и болезней рыб.

В период с 1966 по 1982 гг. С.С. Рыбаков основное внимание уделял изучению процессов биосинтеза РНК, белков и субвирионных структур вируса ящура при размножении его в различных системах с целью подбора оптимальных условий репродукции. В эти же годы им были выполнены исследования по скринингу различных химических соединений для создания препаратов, обладающих вирулицидной и вирусостатической активностью.

В последующие 15 лет исследования С.С. Рыбакова и его учеников были посвящены изучению структуры генома вируса ящура и созданию пептидных противоящурных вакцин, предложены новые подходы к конструированию синтетических иммуногенов, позволившие получить экспериментальные серии вакцин. Итоги многолетней работы обобщены С.С. Рыбаковым в докторской диссертации, которую он защитил в 1992 г. Под его руководством подготовлено и защищено 10 кандидатских диссертаций. В 1994 г. присвоено ученое звание профессора по специальности «молекулярная биология».

В 1997 и 1999 гг. он прошел стажировку по губкообразной энцефалопатии КРС в Ирландии. В 1996–1998 гг. выезжал в командировки в Ирак в качестве эксперта ООН.

Исследования, проводимые под руководством С.С. Рыбакова и направленные на получение синтетических антигенов, позволяющих создавать безопасные стандартные наборы для диагностики многих вирусных болезней животных, являются актуальными на сегодняшний день. Эти изыскания дважды в 1995–1998 гг. получили финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и легли в основу метода выявления антигенов вируса ящура и специфических антител, а также иммуногистохимического метода диагностики скрепи овец.

Под руководством С.С. Рыбакова на базе ВНИИЗЖ был создан Федеральный диагностический центр по губкообразной энцефалопатии КРС и бешенству животных. Сотрудниками центра разработаны методы диагностики губкообразной энцефалопатии КРС и налажена система мониторинга данного заболевания. По материалам исследований и литературным

данным С.С. Рыбаковым опубликованы монографии «Радио-иммунологический анализ» (1984), «Скрепи и другие прионные болезни животных и человека» (2003) и «Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота» (2007).

Большая работа проводилась им в качестве главного эксперта по бешенству и прионным болезням животных, а также главного эксперта сектора по сотрудничеству с МЭБ информационно-аналитического центра Управления ветнадзора.

С.С. Рыбаковым опубликовано свыше 250 научных работ, посвященных, в основном, молекулярно-биологическим аспектам вирусологии, 6 оригинальных разработок защищены авторскими свидетельствами и патентами, отмечены медалями ВДНХ, Почетными грамотами Россельхознадзора и Министерства сельского хозяйства России.

На протяжении нескольких лет он являлся членом специализированных советов по защите диссертаций при ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ГНУ ВНИИВВиМ, членом секции «Ветеринарная биотехнология» РАСХН, членом экспертного совета ВАК РФ, председателем бюро первичной организации и членом правления Владимирской городской организации общества «Знание».

Незаурядный пылливый ум, творческая активность, организаторские способности, высокая ответственность и профессионализм позволили ему достойно пройти путь от аспиранта до заведующего отделом. В последние годы много внимания он уделял подготовке молодых специалистов, возглавляя базовую кафедру «Микробиологии и вирусологии» Владимирского государственного университета в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Сергей Сергеевич пользовался заслуженным авторитетом и уважением среди коллективов ФГБУ «ВНИИЗЖ», ГНУ ВНИИВВиМ и Владимирского государственного университета.

Являясь специалистом в области вирусологии и молекулярной биологии, обладая высокой квалификацией, широкой эрудицией и профессиональной творческой инициативой, он пользовался заслуженным авторитетом среди специалистов как в нашей стране, так и за рубежом.

Научная эрудиция, принципиальность, порядочность и требовательность сочетались с чуткостью и отзывчивостью. Таким он сохранится в памяти сотрудников, студентов и всех, кто с ним общался.

Руководство и сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ» выражают глубокое соболезнование жене, детям, внукам, другим родным и близким покойного.

Администрация ФГБУ «ВНИИЗЖ»
и коллег по работе

ПАМЯТИ ОНУФРИЕВА ВЛАДИСЛАВА ПЕТРОВИЧА (1925–1998 ГГ.) (к 90-летию со дня рождения)

А.М. Рахманов

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

UDC 619 (091)

IN MEMORY OF ONUFRIYEV VLADISLAV PETROVICH (1925–1998) (devoted to 90th Anniversary of his Birth)

A.M. Rakhmanov

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

16 апреля 2015 г. исполнилось 90 лет со дня рождения видного ученого-вирусолога, организатора ветеринарной науки, члена-корреспондента ВАСХНИЛ, РАСХН и УАНН, Заслуженного деятеля науки и техники Украины, участника Великой Отечественной войны, в течение 18 лет проработавшего директором ВНИИЯИ.

В.П. Онуфриев родился в с. Алексеевка Каланчакского района Херсонской области в семье служащих. После окончания неполной средней школы в 1938–1941 гг. учился в Цюрупинском ветеринарном техникуме Херсонской области. В связи с началом войны был мобилизован на оборонительные работы в Крыму. С ноября 1943 по август 1946 гг. служил в Советской армии, участвовал в Великой Отечественной войне,

полтора года воевал разведчиком и командиром отделения моторазведроты в гвардейской стрелковой дивизии. За боевые заслуги награжден 7 орденами и медалями, среди которых ордена Отечественной войны, Славы 2-й и 3-й степени, медали «За отвагу», «За взятие Кенигсберга», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.». После демобилизации с 1946 по 1951 гг. он — студент Харьковского ветеринарного института. В 1951–1955 гг. работал старшим и главным районным ветврачом в Брянской и Днепропетровской областях. В 1955–1958 гг. обучался в аспирантуре Ленинградского научно-исследовательского ветеринарного института, в 1959 г. защитил кандидатскую диссертацию. С 1958 г. на научно-исследовательской работе: старший научный сотрудник лаборатории по изучению ящура Украинского научно-иссле-

довательского института экспериментальной ветеринарии (г. Харьков), заведующий отделом эпизоотологии института животноводства и ветеринарии Таджикской ССР, директор Таджикского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Душанбе).

В марте 1963 г. В.П. Онуфриев был назначен директором Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института (ВНИЯИ) МСХ СССР. В этой должности показал себя хорошим организатором и авторитетным руководителем, умело сочетал административную работу с научно-исследовательской, являясь заведующим лабораторией иммунологии, подготовил и в 1969 г. успешно защитил докторскую диссертацию. На его плечи легли все трудности по строительству мощного современного института, оснащению его необходимым оборудованием, укомплектованию научными кадрами и развертыванию комплексных исследований по проблеме ящура.

В 1975 г. В.П. Онуфриев был избран членом-корреспондентом ВАСХНИЛ, с 1991 г. членом-корреспондентом РАСХН и УАНН, Заслуженным деятелем науки и техники Украины.

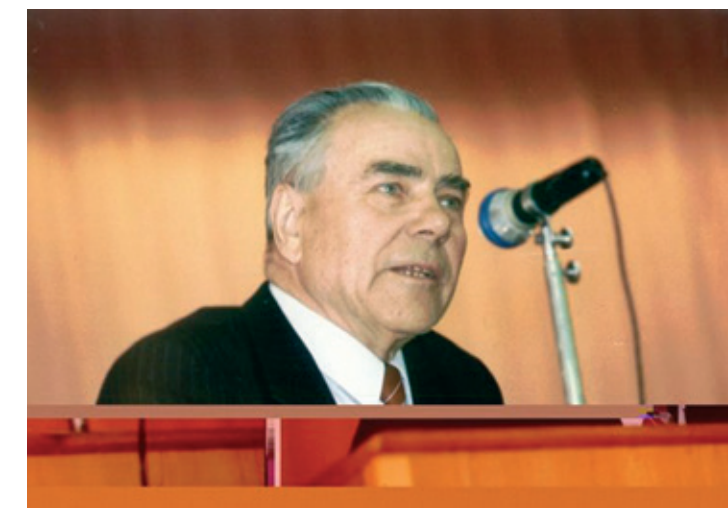
Научные исследования В.П. Онуфриева и учеников были направлены на изучение ящура, мер профилактики и его искоренения в стране. Большое внимание было уделено разработке средств и методов создания пассивного иммунитета у животных различных возрастных групп, а также изучению процесса формирования активного иммунитета при применении инактивированных противоящурных вакцин.

Разработка и внедрение в ветеринарную практику более совершенных средств и методов диагностики, профилактики и борьбы с ящуром способствовали значительному улучшению эпизоотической обстановки и оздоровлению страны от заболеваний животных ящуром.

За успешное выполнение плановой тематики и внедрение полученных результатов в производство институт, возглавляемый В.П. Онуфриевым, неоднократно награждался переходящим Красным Знаменем ЦК КПСС, Совета Министров СССР, ВЦСПС и ЦК ВЛКСМ, дипломами ВДНХ, МСХ СССР, денежными премиями.

За разработку комплекса мероприятий, обеспечивающих ликвидацию эпизоотий ящура в стране, и создание устойчивого благополучия по этой инфекции группа ветеринарных специалистов института была отмечена Государственной премией Российской Федерации в области науки и техники.

В.П. Онуфриев с 1968 по 1981 гг. был председателем Координационного совета стран — членов СЭВ по проблеме ящура и проводил большую работу, направленную на улучшение научных исследований в специализированных лабораториях нашей страны и в странах — членах СЭВ, на быстрое внедрение научных достижений в ветеринарную практику. Он не-



Онуфриев Владислав Петрович. 1981 г.

однократно находился в заграничных командировках и участвовал в работе конгрессов, симпозиумов, сессий МЭБ и СЭВ.

Им опубликовано более 300 научных работ, получено 10 авторских свидетельств на изобретения. Под его научным руководством подготовлено 14 докторов и около 40 кандидатов наук.

В.П. Онуфриев являлся председателем ученого и диссертационного советов ВНИИЯИ, членом диссертационного совета ВНИИВВиМ (г. Покров), членом экспертного совета ВАК СССР.

Наряду с этим вел большую общественную работу — с 1963 г. ежегодно избирался членом партбюро института, с 1964 г. был кандидатом в члены, а с 1966 по 1980 гг. членом Владимирского обкома КПСС.

За успехи, достигнутые в разработке и внедрении в производство научных исследований в области сельского хозяйства, награжден орденами Ленина, Трудового Красного Знамени (дважды), дипломами и Почетными грамотами ВДНХ.

22 апреля 1981 г. приказом министра сельского хозяйства СССР В.П. Онуфриев был освобожден от должности директора ВНИИЯИ в связи с переходом на работу заведующим кафедрой микробиологии, вирусологии и лабораторией Украинской сельскохозяйственной академии (г. Киев), которой он руководил до своей смерти 16 декабря 1998 г.

Научная эрудиция, профессиональная инициатива, целеустремленность Владислава Петровича сочетались с чуткостью, отзывчивостью, и все это снискало ему заслуженный авторитет, глубокое уважение и широкую известность в нашей стране и за рубежом. Таким он остается в памяти своих коллег и всех, кто с ним общался.

СОТРУДНИЧЕСТВО ВЕТЕРИНАРНЫХ СЛУЖБ ГОСУДАРСТВ — УЧАСТНИКОВ СНГ

Д.А. Лозовой¹, А.М. Рахманов²

¹врио директора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: losovoy@arriah.ru

²доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Представлена информация о заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ, которое проходило в г. Сочи 19–20 февраля 2015 г. На заседании были заслушаны и обсуждены различные вопросы, касающиеся совместных действий ветеринарных служб государств — участников СНГ.

Ключевые слова: Россельхознадзор, ветеринарные службы, СНГ.

COLLABORATION BETWEEN VETERINARY SERVICES OF CIS COUNTRIES

D.A. Lozovoy¹, A.M. Rakhmanov²

¹ Acting Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: losovoy@arriah.ru

² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The Article gives information on the meeting of CIS Intergovernmental Council for Collaboration in the Field of Veterinary Medicine which was held in Sochi, February 19–20, 2015. Different issues related to joint actions of the CIS Veterinary Services were discussed at the meeting.

Key words: Rosselkhoznadzor, Veterinary Services, CIS.

19–20 февраля 2015 г. в г. Сочи (Россия) проходило очередное заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ. В работе Совета принимали участие руководители и представители государственных ветеринарных служб Армении, Беларуси, Казахстана, Киргизии, Молдовы, России, Узбекистана, а также Исполнительного комитета СНГ. Самой представительной была делегация от России: директор Департамента ветеринарии МСХ РФ С.Г. Дресвянникова и её заместитель П.А. Смышляева, заместитель руководителя Россельхознадзора Е.А. Непоклонов, от ФГБУ «ВНИИЗЖ» врио директора Д.А. Лозовой и сотрудники А.К. Караулов и И.А. Чвала, от ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» А.В. Иванов и сотрудники А.Р. Валиуллин и Е.А. Петрова, от ФГБУ «ВГНКИ» заведующий отделом Б.В. Виолин, от ФКП «Щелковский биокомбинат» заместитель директора Е.Н. Крюкова и от ФКП «Ставропольская биофабрика» директор В.И. Заерко. В качестве приглашенных на заседании присутствовали от ветеринарной службы Абхазии 4 ветспециалиста во главе с начальником Э.А. Аншба, от Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) — М. Тайтубаев и от Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) — О.В. Арнауттов.

В соответствии с существующим положением председателем Совета на очередной срок был избран В.П. Пивовар — главный государственный ветеринарный врач, главный государственный ветеринарный инспектор Республики Беларусь. На заседании были заслушаны и обсуждены различные вопросы, касающиеся совместных действий ветеринарных служб государств — участников СНГ.

Заместитель директора Департамента экономического сотрудничества Исполнительного комитета СНГ А.М. Кули-Заде доложил о проводимой работе по подготовке проекта Плана мероприятий по реализации III этапа (2016–2020 гг.) Стратегии экономического развития на период до 2020 г. государств — участников СНГ и о подготовке в соответствии с решением Экономического совета СНГ от 12 декабря 2014 г. проекта Плана совместных действий государств — участников СНГ по решению актуальных вопросов в финансово-экономической сфере. Членам совета — руководителям ветеринарных служб государств — участников СНГ рекомендовано продолжить работу по реализации мероприятий указанной Стратегии и принять необходимые меры по подготовке предложений о механизмах реализации положений Договора о зоне свободной торговли СНГ от 18 октября 2013 г. в современных условиях.

Руководители и представители ветеринарных служб государств — участников СНГ представили информацию об эпизоотической ситуации на территории Содружества. Членам совета рекомендовано продолжить работу по обеспечению эпизоотического благополучия упомянутой территории и своевременной нотификации возникновения инфекционных заболеваний животных, ежеквартально представлять информацию о меняющейся обстановке.

Руководитель информационно-аналитического центра Управления ветнадзора А.К. Караулов информировал о решении Совета глав правительств СНГ от 30 мая 2014 г. о Комплексе совместных мер государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром на период до 2020 г. Следует напомнить, что после обсуждения проекта этого документа на заседании ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» 26.12.2012 г. он был направлен



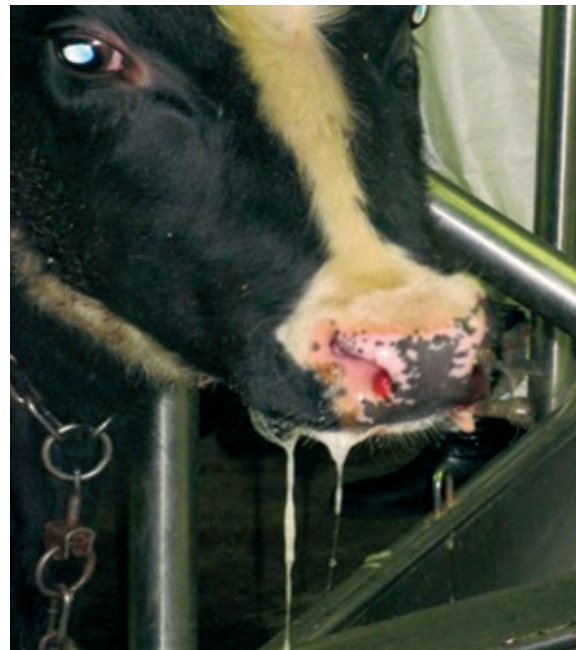
Группа ветеринарных специалистов из Республики Казахстан на стажировке по ящуру во ВНИИЗЖ

в Россельхознадзор, Исполком СНГ, Департамент ветеринарии МСХ РФ и руководителям ветеринарных служб всех государств — участников СНГ для согласования, уточнений и дополнений. С учетом сделанных дополнений и уточнений проект документа был вынесен на рассмотрение Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ, на заседании которого 05.04.2013 г. он был одобрен и затем Исполкомом СНГ был направлен на согласование в правительства государств — участников СНГ. В связи с этим Армения, Казахстан, Киргизия, Молдова, Таджикистан и Украина сообщили об отсутствии замечаний по проекту. Предложения и замечания Азербайджана, Беларуси и России носили редакционный характер и в основном были учтены. Затем проект был рассмотрен и одобрен на заседаниях Комиссии по экономическим вопросам 16.10.2013 г. и Экономического совета СНГ 13.12.2013 г. Было принято решение внести указанный проект на рассмотрение Совета глав правительств СНГ, который на своем заседании 30 мая 2014 г. в г. Минске принял решение утвердить Комплекс совместных мер государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром на период до 2020 г. Было рекомендовано правительствам государств-участников СНГ принять необходимые меры по реализации мероприятий указанного Комплекса.

В течение 2014 г. проводились мероприятия по обучению ветеринарных специалистов, повышению их квалификации, проведению международных сличительных испытаний, по оказанию помощи в диагностике ящура, в обеспечении диагностики, планировании, организации и проведении противоэпизоотических мер и т.п. Эта работа обобщена и представлена на заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ 19 февраля 2015 г. в виде доклада. После его обсуждения было рекомендовано членам совета принять необходимые меры по обеспечению программных мероприятий по реализации Комплекса совместных мер и подготовить к очередному заседанию Совета в 2016 г. для рассмотрения информацию о ходе его реализации. ФГБУ «ВНИИЗЖ», как координатору работы и мероприятий по Комплексу совместных мер, поручено обобщить информацию руководителей ветеринарных служб государств — участников СНГ и внести её в Исполнительный комитет СНГ.



Клиническое обследование зараженного ящуром животного во ВНИИЗЖ



Была заслушана информация директора ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» А.В. Иванова и руководителей ветеринарных служб о мерах профилактики и борьбы с бешенством в государствах — участниках СНГ. Руководителям ветеринарных служб государств — участников СНГ поручено провести анализ эпизоотической и эпидемиологической обстановки по бешенству на территории Содружества за 5 лет. Результаты анализов по основным источникам возбудителя, тенденции распространения болезни и наносимого ущерба представить на заседании Совета в 2016 г.

Принята к сведению информация представителя ФГБУ «ВГНКИ» Б.В. Виолина и руководителей ветеринарных служб о проблемах антимикробной резистентности и путях решения данной проблемы. Членам совета рекомендовано подготовить и внести предложения по проблемам антимикробной резистентности, а также по вопросам применения гормональных препаратов в области ветеринарии в целях выработки общего подхода по данной проблеме.

Заместитель директора Департамента ветеринарии МСХ РФ П.А. Смышляева в своем выступлении указала на необходимость разработки новой редакции Соглашения о сотрудничестве в области ветеринарии от 12 марта 1993 г. и Положения о Межправительственном совете по сотрудничеству в области ветеринарии от 26 декабря 1995 г. Поручено руководителям ветеринарных служб в срок до 1 июля 2015 г. направить в секретариат Совета свои предложения по этим документам.

Принята к сведению информация заместителя руководителя Россельхознадзора Е.А. Непоклонова о предложениях по внесению изменений в Единые правила государственного ветеринарного надзора при

международных и межгосударственных перевозках животноводческих грузов, утвержденных решением Совета 5 ноября 2003 г. в части, касающейся перевозок подконтрольных Госветнадзору грузов между государствами СНГ.

По докладу начальника ветеринарной инспекции Государственной службы безопасности продуктов питания МСХ Армении О.А. Мкртчана о включении ветеринарных мер в проект Плана мероприятий по реализации Концепции межрегионального и приграничного сотрудничества государств — участников СНГ до 2020 г. принято обращение к членам совета принять необходимые меры по реализации Плана мероприятий по сотрудничеству в области упомянутых ветеринарных мер.

Директор Департамента ветеринарии МСХ РФ С.Г. Дресвянникова выступила с отчетом о деятельности Межправительственного совета в 2006–2014 гг. по сотрудничеству в области ветеринарии, который получил одобрение.

С интересом было выслушано сообщение В.П. Пивовара — главного государственного ветеринарного врача, главного государственного ветеринарного инспектора Республики Беларусь об организации работы ветеринарной службы в этой стране.

В перерывах между заседаниями Е.А. Непоклонов, С.Г. Дресвянникова, Д.А. Лозовой провели деловые переговоры с представителями ветеринарных служб стран СНГ по расширению сотрудничества по обеспечению ветеринарного благополучия территорий Содружества. Следующее заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ намечено провести в Республике Беларусь в I квартале 2016 г.

УДК 619:061(470)

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ФИЛИАЛА ФГБУ «ВНИИЗЖ» В РЕСПУБЛИКЕ КРЫМ

С.И. Данильченко¹, Е.С. Кузина², И.В. Бородкина³

¹ директор, кандидат ветеринарных наук, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Симферополь, Республика Крым

² руководитель сектора, ветеринарный врач, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Симферополь, Республика Крым

³ ветеринарный врач, младший научный сотрудник, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Симферополь, Республика Крым, e-mail: borodkina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлена информация о создании филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым и этапах его развития. Рассматриваются некоторые аспекты его деятельности и анализируются полученные результаты.

Ключевые слова: безопасность пищевых продуктов, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым.

UDC 619:061(470)

ACTIVITIES OF THE FGBI «ARRIAH» BRANCH IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

S.I. Danilchenko¹, Ye.S. Kuzina², I.V. Borodkina³

¹ director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH» Branch, Simferopol, Republic of Crimea

² sector head, veterinarian, FGBI «ARRIAH» Branch, Simferopol, Republic of Crimea

³ veterinarian, junior researcher, FGBI «ARRIAH» Branch, Simferopol, Republic of Crimea, e-mail: borodkina@arriah.ru

SUMMARY

The information on the establishment of the FGBI «ARRIAH» Branch in the Republic of Crimea and stages of its development is given in the paper. Some aspects of its activities are under review and obtained results are analyzed.

Key words: food safety, FGBI «ARRIAH» Branch in the Republic of Crimea.

Во все времена одной из величайших проблем человечества была и до сих пор остается проблема обеспечения населения качественными и, главное, безопасными продуктами питания [1]. Не является исключением и население Крымского полуострова. Особая значимость этого вопроса для Крыма связана с курортной направленностью его деятельности и развитием сельского хозяйства.

Применение в сельском хозяйстве минеральных удобрений, средств защиты растений и животных, обладающих антимикробными свойствами, привело к тому, что сырье содержит остаточные их количества даже без добавления консервантов. Готовая продукция может также содержать некоторое количество указанных веществ. Данное обстоятельство диктует необходимость установить предельно допустимые количества таких веществ в пищевых продуктах. Поэтому в проекте технического регламента Таможенного союза (ТР ТС) «О безопасности пищевых продуктов» устанавливаются максимально допустимые уровни остаточного содержания антимикробных, антигельминтных, инсектицидных веществ, транквилизаторов, гормональных препаратов [4].

В компетенцию государственной ветеринарной службы Российской Федерации в области защиты населения от болезней, общих для человека и животных, и пищевых отравлений входит осуществление ветери-



Рис. 1. Испытание пищевых продуктов в секторе микробиологических исследований лаборатории экспертизы пищевых продуктов в Республике Крым

нарно-санитарной экспертизы продуктов животного происхождения. Мясо и мясопродукты, молоко и молокопродукты, яйца, рыба и морепродукты, мёд, иные продукты животного (на всех этапах их прохождения) и растительного (на продовольственных рынках) происхождения подлежат обязательной ветеринарно-санитарной экспертизе с целью определения их пригодности к использованию для пищевых целей [3].

В связи со сложившейся политической ситуацией и возникновением в Российской Федерации двух новых субъектов — Республики Крым и города федерального значения Севастополь — возникла необходимость создания на полуострове мощной лабораторной базы, которая будет способствовать снижению рисков проникновения болезней животных, а также станет основным фактором обеспечения безопасности продукции. Эти функции были возложены на филиал ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») (далее Филиал), который был образован 23 апреля 2014 г. в г. Симферополе. Возглавляет его кандидат ветеринарных наук Данильченко Сергей Иванович.

Распоряжением Совета Министров Республики Крым от 06.06.14 № 484-Р «О передаче имущества», а также Распоряжением Совета Министров Республики Крым от 21.10.14 № 1080-Р «О внесении изменений в некоторые распоряжения Совета Министров Республики Крым» в структуру Филиала вошли нежилые здания и сооружения, расположенные по адресу: г. Симферополь, ул. Шоссейная, 21а, в составе: административный корпус с подвалом, лабораторно-производственный комплекс, склад, виварий, крематорий, хозяйственные постройки, склады, подсобные помещения, инженерные сети и коммуникации. Площадь всей территории составляет 0,89 га.

В ноябре 2014 г. в Филиале завершён 1-й этап подготовки к осенне-зимнему периоду. На сегодняшний день усиленными темпами проводятся работы по реконструкции помещений, благоустройству прилегающей территории. По плану все работы по реконструкции лабораторий Филиала завершатся к апрелю 2015 г.

В середине ноября в ходе своего рабочего визита Филиал посетил руководитель Россельхознадзора Сергей Алексеевич Данкверт. Он отметил быстрый темп проведения реконструкции, высокий потенциал развития лабораторной базы и научно-исследовательской работы.

На сегодняшний день штат сотрудников практически укомплектован. Научные кадры Филиала представлены четырьмя кандидатами ветеринарных наук, одним аспирантом и двумя магистрами ветеринарной медицины. Благодаря мощной научной базе ФГБУ «ВНИИЗЖ»

в г. Владимире многие работники Филиала получили возможность заниматься научной деятельностью и повышать свой профессиональный уровень. Так, за 2014 г. десять сотрудников филиала прошли обучение в ФГБУ «ВНИИЗЖ» по программам дополнительного профессионального образования.

Утвержден план рабочих поездок сотрудников на 2015 г. с целью обучения новым методам исследований, повышения квалификации, участия в семинарах. В будущем большая роль в решении поставленных перед Филиалом задач отводится молодым ученым, способным принимать нестандартные, творческие подходы, владеющим современными методиками исследований, обладающим конкурентной способностью на научном поприще.

В Филиале проводят работу 4 лаборатории: лаборатория болезней птиц, лаборатория диагностики инфекционных болезней животных, лаборатория ихтиопатологий и ветеринарно-санитарной экспертизы морских рыб и беспозвоночных, лаборатория экспертизы пищевых продуктов.

Основной деятельностью лаборатории болезней птиц является эпизоотологический мониторинг инфекционных заболеваний птиц. Такая направленность связана с особенностью Крымского полуострова, на котором пересекаются четыре основных пути миграции диких перелетных птиц, и риск заражения заболеваниями довольно велик. Кроме того, лаборатория проводит вирусологические (выделение и идентификация вируса с помощью куриных эмбрионов), серологические (РТГА, ИФА), бактериологические (сальмонеллез, колибактериоз, пастереллез и др.) исследования, определение чувствительности микрофлоры к антибиотикам.

Лаборатория ихтиопатологий и ветеринарно-санитарной экспертизы морских рыб и беспозвоночных занимается паразитологическими и бактериологическими исследованиями основных промысловых рыб бассейнов Черного и Азовского морей и внутренних водоемов Республики Крым.

Лаборатория диагностики инфекционных болезней животных диагностирует бактериальные и паразитарные заболевания животных, проводит химический анализ кормов, проверяет корма на зараженность плесневыми грибами. В своих исследованиях охватывает территорию Республики Крым, обслуживает хозяйства всех форм собственности.

Лаборатория экспертизы пищевых продуктов проводит органолептические, микробиологические, химико-токсикологические, физико-химические, радиологические исследования пищевых продуктов отечественного и зарубежного происхождения [2] (рис. 1).

На данный момент ее развитию уделяется наибольшее внимание.

За истекший 2014 г. Филиал заключил 41 контракт с поставщиками продукции украинских производителей на исследование продукции, ввозимой на территорию Республики Крым.

В прошедшем году сотрудники Филиала принимали участие в выполнении государственного задания при активном сотрудничестве с Территориальным управлением Россельхознадзора по Республике Крым и г. Севастополь. В рамках государственного задания было проведено 388 испытаний. Все поступившие образцы были испытаны на соответствие техническому регламенту Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», техническому регламенту Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [4, 5].

Всего за прошедший 2014 г. в Филиал поступило 365 образцов пищевых продуктов, произведенных на 49 предприятиях Украины.

Лабораторией экспертизы пищевых продуктов выполнено 7052 испытания, из них органолептических — 1460, микробиологических — 1970, физико-химических — 913, химико-токсикологических — 1979, радиологических — 730. Соотношение проведенных испытаний представлено на рис. 2, из которого следует, что наибольший процент занимают химико-токсикологические испытания — 28,06%, на втором месте микробиологические испытания — 27,94%, далее следуют органолептические — 20,7% и физико-химические 12,95% исследования. Наименьший процент приходится на долю радиологических испытаний — 10,35%.

За прошедший год выявлено 39 несоответствий, что составляет 0,57% от общего количества проведенных испытаний. Из них в 15 случаях выявлены бактерии группы кишечной палочки (БГКП), что составляет 38,46% от общего числа выявленных несоответствий, в 14 случаях — дрожжи и плесени, что составляет 35,88%, в 1 случае превышено количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), соответственно 2,57%, в 6 случаях обнаружено несоответствие по содержанию белка, что составляет 15,38%, также 2,57% приходится на долю 1 случая выявления несоответствия по содержанию молочнокислых бактерий, 5,14% занимают 2 несоответствия по органолептическим показателям (рис. 3).

Рис. 3. Структура показателей, по которым выявлены несоответствия пищевой продукции требованиям нормативных документов

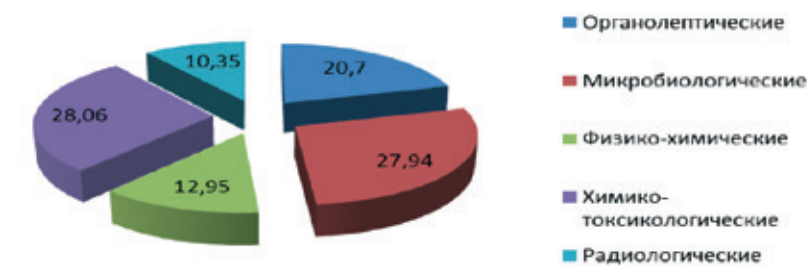
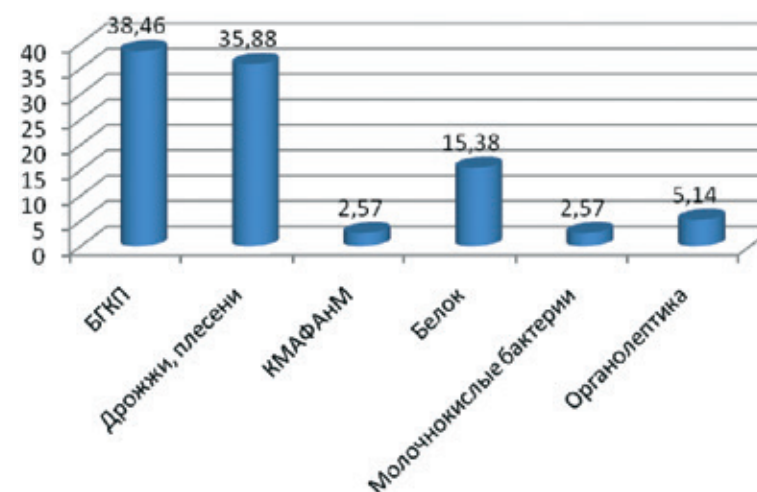


Рис. 2. Количество испытаний, выполненных в 2014 г. в лаборатории экспертизы пищевых продуктов Филиала

Полученные данные свидетельствуют о том, что на первом месте среди выявленных несоответствий стоят нарушения по санитарно-гигиеническим показателям и показателям порчи, что в свою очередь говорит о неудовлетворительном санитарном состоянии производства пищевых продуктов на предприятиях Украины.

Таким образом, подведя итоги вышеизложенного, можно сказать, что одним из важных этапов развития ветеринарной медицины в Республике Крым стало создание в 2014 г. филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым. Уже сделаны значительные шаги по его развитию и реконструкции помещений, проведены исследования, получены результаты.

В последующем перед сотрудниками лаборатории ставятся непростые задачи, запланирован большой объем работ. Но у коллектива Филиала есть силы, ФГБУ «ВНИИЗЖ» всячески поддерживает и помогает им, а самое главное — это огромное желание расти и двигаться вперед.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Очирова Л.А. Микробиологическая оценка безопасности пищевых продуктов: автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Барнаул, 2008. — 26 с.
2. Прокопенко С.Т., Дмитриченко М.И., Еремина М.А. Факторы, определяющие качество пищевой продукции // Техничко-технологические проблемы сервиса. — 2012. — Т. 21, № 3. — С. 81–86.
3. Смирнов А.М. Государственная система контроля и ветеринарные требования к пищевым продуктам животного происхождения // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. — 2004. — № 1. — С. 23–26.
4. Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».
5. Технический регламент Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

ВОЕННОЕ ПОКОЛЕНИЕ СОТРУДНИКОВ

ВСЕСОЮЗНОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЯЩУРНОГО ИНСТИТУТА — ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

(к 70-летию Победы в Великой Отечественной войне)

А.М. Рахманов¹, Б.А. Глушко²

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

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

РЕЗЮМЕ

Приведены сведения о сотрудниках ВНИИЗЖ — участниках Великой Отечественной войны, тружениках тыла и детях войны.

Ключевые слова: участники Великой Отечественной войны, труженики тыла, дети войны, сотрудники.

WAR GENERATION OF PERSONNEL WORKING

IN THE ALL RUSSIAN FMD RESEARCH INSTITUTE, FGBI «FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH»

(devoted to 70th Anniversary of the Great Patriotic War)

A.M. Rakhmanov¹, B.A. Glushko²

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

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

SUMMARY

The article presents information about the personnel of the FMD Research Institute and FGBI «ARRIAH» — veterans of the Great Patriotic War, home-front workers and children born during the war.

Ключевые слова: veterans of the Great Patriotic War, home-front workers, children born during the war, personnel.

При формировании института в его коллектив было зачислено немало участников Великой Отечественной войны и тружеников тыла. В год празднования 70-летия Победы над фашизмом считаем своим долгом хотя бы в сжатой форме рассказать об этих сотрудниках, работавших в разное время вместе с нами на различных должностях и внесших немалый вклад в достижения Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института (с 1992 г. — Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных, с 2003 г. — ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», с 2011 г. — ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

К их числу относятся в первую очередь участники войны Е.В. Андреев, Л.П. Антипов, Л.И. Антоненко, В.Н. Бизев, А.А. Бойко, Г.К. Бояджан, А.Н. Бурдов, Л.Л. Воейков, К.П. Ганцева, К.Ф. Глобенко, Е.К. Годовиков, А.Д. Деревенцева, М.В. Дутиков, В.И. Зайцев, И.В. Zubov, А.М. Калинин, А.К. Карпов, И.С. Кирюшов, Н.В. Ключник, Е.Н. Королев, М.А. Кочергин, Н.В. Кудрявцев, А.С. Куповых, Б.Ф. Лебедев, К.Н. Макаров, П.В. Малярец, Н.П. Маслов, И.И. Матюшин, Н.Ф. Махров, Н.Г. Медведев, К.М. Никитин, В.П. Онуфриев, П.Е. Пешев, Я.И. Пральников, П.Н. Резников, К.Р. Ржевский, В.Ф. Сафронов, А.Ф. Сергеев, И.В. Смирнов, П.А. Сорокин, В.А. Степанов, А.А. Сюсюкин, В.А. Телечук, Н.Я. Фесюн, И.П. Филатов, Н.С. Фомин, Ю.Н. Ховряков, В.С. Худяков, Н.И. Чернов, С.И. Чернышев, С.Н. Чупенков, Л.Н. Шубин.

Большинство из них после школы или даже со школьной скамьи были призваны в действующую армию и прошли тяжелыми дорогами войны рядовыми, сержантами и офицерами. Эти совсем молодые ребята, участвуя в боевых действиях, проявляли мужество, храбрость, доблесть, связанные с риском для жизни. Все они прошли через трудные сражения, теряя своих боевых товарищей, лежали в госпиталях с тяжелыми ранениями и контузиями.

Некоторым из тех, кто был постарше и до войны успел окончить ветеринарные институты (Е.В. Андреев, А.А. Бойко, П.В. Малярец, Н.Ф. Махров, П.А. Сорокин), военную службу как ветеринарным специалистам пришлось проходить ветврачами полков, в эвакуационных, ветлазаретах и военных ветлабораториях разного уровня.

За свои подвиги участники войны были награждены боевыми орденами и медалями. Так, Владислав Петрович Онуфриев полтора года воевал разведчиком и командиром отделения моторазведроты в гвардейской стрелковой дивизии и был награжден орденами Отечественной войны, Славы 2-й и 3-й степени, медалями «За отвагу», «За взятие Кенигсберга», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.».

Алексей Андреевич Сюсюкин был отмечен орденом Отечественной войны, медалями «За боевые заслуги» (дважды), «За взятие Будапешта», «За взятие Вены», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.».

Леонид Павлович Антипов был награжден двумя орденами Красной Звезды, медалями «За отвагу» (дважды), «За воинскую доблесть», «За освобождение Варшавы», «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.», двумя польскими крестами и тремя польскими медалями.

Леонид Николаевич Шубин наряду с другими боевыми наградами получил и орден Александра Невского.



Ветераны Великой Отечественной войны на встрече во ВНИИЗЖ

После окончания войны и демобилизации из армии многие из них учились на различных курсах, в профтехучилищах, в средних и высших учебных заведениях, овладевали разными специальностями и активно участвовали в послевоенном восстановлении народного хозяйства, прилагали свои силы, опыт и знания для улучшения жизни истерзанного войной народа. Некоторые из них внесли существенный вклад в ветеринарную науку. Восемь человек защитили кандидатские (Г.К. Бояджан, И.В. Zubov, Н.В. Кудрявцев, И.И. Матюшин, Н.Ф. Махров, И.П. Филатов, Л.Н. Шубин, П.В. Малярец) и шесть — докторские диссертации (Е.В. Андреев, А.А. Бойко, А.Н. Бурдов, Л.Л. Воейков, В.П. Онуфриев, А.А. Сюсюкин).

Примечательно, что первые три директора института являлись участниками Великой Отечественной войны: А.А. Сюсюкин возглавлял институт в 1961–1963 гг., В.П. Онуфриев — в 1963–1981 гг., А.Н. Бурдов в 1981–1992 гг. Заведующими научными лабораториями и отделами в разное время были участники Великой Отечественной войны, а затем доктора наук, профессора: Л.Л. Воейков, В.П. Онуфриев, А.А. Сюсюкин, кандидаты наук: Е.В. Андреев, А.А. Бойко, П.В. Малярец, И.И. Матюшин, И.П. Филатов. В течение длительного времени в институте работали старшими научными сотрудниками кандидаты наук Г.К. Бояджан, И.В. Zubov, Н.В. Кудрявцев, Н.Ф. Махров, которые возглавляли научные группы и успешно выполняли плановую тематику института. Некоторые участники Великой Отечественной войны руководили другими подразделениями и службами института. Так, К.Н. Макаров работал заместителем директора института, Б.Ф. Лебедев возглавлял ветеринарно-санитарный отдел, обеспечивающий безопасность проведения работ в институте с различными высококонтагиозными возбудителями инфекционных болезней животных. Л.П. Антипов был начальником ведомственной милиции, охранявшей институт.

Большую работу по подбору, оформлению и становке кадров, особенно научно-технического и инженерно-хозяйственного персонала, проводил отдел кадров, начальником которого с первых шагов его деятельности в течение долгого времени был гвардии подполковник ветеринарной службы в отставке П.А. Сорокин, затем, также участники Великой Отечественной войны, А.С. Куповых и Н.П. Маслов. Общеинститутскую профсоюзную организацию в разные годы возглавляли П.А. Резников и В.А. Степанов.

Ветераны Великой Отечественной войны — люди неравнодушные, активные, поэтому они всегда участвовали в общественной жизни института, привлекая к ней молодых сотрудников. Они активно работали в профсоюзе, оборонно-спортивных и других общественных организациях, участвовали в военно-патриотической работе, пользовались авторитетом в коллективе института. Во время работы в Институте за достижения в труде и общественной жизни отмечались правительственными наградами, почетными грамотами, благодарностями, денежными премиями.

Великая Отечественная война коренным образом изменила жизнь советских людей, легла тяжелым бременем на всех. Военнообязанные ушли на фронт или были призваны в трудовую армию. В городах, селах и деревнях остались старики, женщины и дети.

Война отняла у детей и подростков детство, заставила их раньше времени взрослеть и выполнять обязанности взрослых. Они вынуждены были заменить ушедших отцов, братьев и сестер, работать в любую погоду на улице и в холодных помещениях. Часто они не доедали, не досыпали, ходили в поношенной одежде и обуви, оставшейся от взрослых.

Они трудились на полях и фермах в колхозах и совхозах, у станков на фабриках, заводах и в мастерских, ухаживали за ранеными бойцами в госпиталях, помогали взрослым выращивать и убирать урожай, пасти, ухаживать за животными и лечить их, доить коров, пахать землю, заготавливать корма, собирать колоски, картофель, свеклу, производить промышленную продукцию. Основная часть полученного урожая, сельскохозяйственной и промышленной продукции отправлялась на фронт. В те годы обязательным для всех был лозунг «Все для фронта, все для победы!».

Своим трудом они внесли посильный вклад в обеспечение Красной армии и населения сельскохозяйственной и промышленной продукцией, в дело победы советского народа над фашизмом. Они выдержали тяжелые испытания войны, лишения, потерю близких, отцов, братьев, сестер. Их труд отмечен медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.». К таким труженикам тыла из числа сотрудников нашего института относятся Е.В. Бельтер, З.А. Белякова, А.И. Бойков, С.А. Бородин, С.В. Вавилова, М.В. Власова, К.И. Гераськин, А.С. Григорьева, Ф.В. Дементьева, С.В. Денисова, Т.Е. Калугина, М.Ф. Карпова, Н.И. Корнилова, И.К. Кравец, А.В. Крылова, Г.А. Кудрявцева, Т.А. Леонтьева, Е.Е. Михайлова, Е.И. Мичурина, Ю.Ф. Монахов, М.А. Павлова, А.И. Поляков, З.Ф. Серова, М.С. Сюсюкина, А.П. Худякова, Н.Е. Цветкова, А.А. Черняева, Ю.В. Чунаев, Е.В. Шлыков и другие. После войны они продолжали добросовестно трудиться в различных отраслях народного хозяйства, в том числе и в нашем институте.

По 30–50 лет проработали в нашем институте дети войны, которым также нелегко пришлось в те годы. К ним относятся профессора В.И. Диев, А.И. Дудников, В.М. Захаров, Н.А. Перевозчикова, А.М. Рахманов, С.С. Рыбаков, В.Л. Узюмов, Ю.А. Черняев, Ж.А. Шажко, доктора наук Л.А. Глобенко, А.А. Дороговцев, М.В. Котова, И.С. Кучмасов, Н.С. Мамков, А.П. Пономарев, Н.А. Улупов. Они активно участвовали в выполнении плановой тематики, совершали изобретения, руководили научными

группами и подразделениями, публиковали научные статьи, внедряли полученные результаты в производство, защищали кандидатские и докторские диссертации. Более подробно деятельность наших сотрудников — участников войны, тружеников тыла и детей войны описана в книгах А.М. Рахманова и В.Л. Узюмова «История ВНИИИ-ВНИИЗЖ (1958–2003 гг.)» (г. Владимир, 2003 г.) и «История Федерального центра охраны здоровья животных (1958–2008 гг.)» (г. Владимир, 2008 г.).

Очень тяжелой, полной лишений, была жизнь в годы войны в блокадном Ленинграде. Ее пережили наши сотрудники Т.Н. Быкова и А.В. Чепуркин, которые в то время были малолетними детьми. В память о тех годах они награждены знаком «Жителю блокадного Ленинграда».

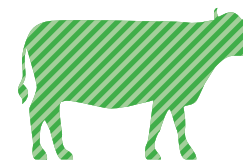
Фашистские захватчики угоняли с оккупированных ими территорий в рабство наших женщин, подростков и детей. Так, А.С. Назаров в начале февраля 1943 г. из оккупированной Орловской области был угнан вместе с матерью и старшим братом в Литву, где они были заключены в концлагерь «Алитус». В течение полугода они находились за колючей проволокой. В этом концлагере, который называли литовским Освенцимом, было замучено и расстреляно около 100 тысяч советских граждан — военнопленных и мирных жителей. Оставшихся в живых заключенных освободили части наступавшей Красной армии.

Такие тяжелые испытания военного лихолетья пришлось вынести нашему народу, и это остается в памяти не только тех, кто пережил то время, но и последующих поколений.

Время неумолимо берет свое. К настоящему времени в институте, к сожалению, уже никто из участников Великой Отечественной войны и тружеников тыла не работает, но они не порывают связей с институтом. Совет ветеранов войны и труда, который многие годы возглавляет кандидат ветеринарных наук Б.А. Глушко, вместе с дирекцией института и профкомом проводит встречи и собрания ветеранов Великой Отечественной войны, особенно по праздничным датам, с вручением подарков и сувениров, организует посещения и поздравления на дому тех, кто по состоянию здоровья не может присутствовать на встречах, оказывает содействие в получении материальной помощи со стороны дирекции института, в частности на лекарства, санаторное лечение, к юбилейным датам и т.п.

Все дальше уходят в историю героические события Великой Отечественной войны, но мы не должны забывать о подвиге советских людей, отстоявших свободу и независимость нашей Родины.

Обращая свои взоры к ветеранам Великой Отечественной войны и труженикам тыла, в канун 70-летия нашей победы необходимо еще раз отметить, что они служат достойным примером для молодого поколения нашего института. Сотрудники института помнят участников Великой Отечественной войны и тружеников тыла, помнят то время, когда они работали в нашем институте, полные сил и энергии, благодарны им за это и особенно за их военный и трудовой подвиг в тяжелые дни войны, за их вклад в развитие и достижения нашего института. Желаем им крепкого здоровья и долгих лет жизни, всегда рады видеть их в стенах нашего учреждения.



БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

УДК 619:616.98:578:57.082.26

АДАПТАЦИЯ ВИРУСА БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГА К ПЕРЕВИВАЕМЫМ КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

С.В. Кононова¹, А.А. Нестеров², В.В. Думова³, Б.Л. Манин⁴, А.В. Кононов⁵, Ю.Ю. Бабин⁶, О.Г. Губенко⁷

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

² ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁶ младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁷ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Исследовали возможность адаптации вируса болезни Шмалленберга к линиям перевиваемых культур клеток различного происхождения. Признаки адаптации вируса были установлены в перевиваемых культурах клеток ВНК-21, ПС, Vero, ПО и Mark-145. Наиболее продуктивными оказались культуры клеток ВНК-21, ПС и Vero. Указанные линии культур клеток могут представлять интерес при выборе чувствительных систем для культивирования данного возбудителя с целью получения активного вирусосодержащего материала.

Ключевые слова: вирус болезни Шмалленберга, культура клеток, инфекционная активность.

UDC 619:616.98:578:57.082.26

ADAPTATION OF SCHMALLENBERG VIRUS TO CONTINUOUS CELL CULTURES

S.V. Kononova¹, A.A. Nesterov², V.V. Dumova³, B.L. Manin⁴, A.V. Kononov⁵, Yu.Yu. Babin⁶, O.G. Gubenko⁷

¹ senior researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

² leading veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ senior researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁴ leading researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁵ senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁶ junior researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁷ leading biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

A capability to adapt Schmallenberg virus to continuous cell cultures of different origin was investigated. The evidence of virus adaptation was established in continuous cell cultures BHK-21, porcine kidney, Vero, ovine kidney and Mark-145. The more efficient cell cultures were BHK-21, PK and Vero. The aforementioned cell cultures could be of interest when choosing sensitive systems for cultivation of the agent for the purpose of receiving active virus-containing material.

Key words: Schmallenberg virus, cell culture, infectious activity.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь, вызванная вирусом Шмалленберга (*Schmallenberg virus*), впервые была зарегистрирована в Германии [7, 8]. В соответствии с географическим расположением ферм, из которых поступил биоматериал, возбудитель был назван вирусом болезни Шмалленберга (ВБШ) [8, 9].

ВБШ относится к роду *Orthobunyavirus*, семейству *Bunyaviridae*. По данным генетического анализа, он филогенетически близок с представителями серологической группы *Simbu* — вирусами болезней Акабане, Айно и Шамонда [5].

Вирус патогенен для крупного рогатого скота, овец и коз независимо от возраста [4].

Заболевание характеризуется желудочно-кишечными расстройствами, повышением температуры тела, высокой частотой аборт, мертворождений и смертностью среди новорожденных. Тяжелее заболевание протекает у овец и коз и характеризуется большим процентом гибели, истощением, поражением репродуктивных органов [1–4].

Вирус болезни Шмалленберга распространяется тремя основными путями: трансмиссивным, трансплацентарным и через сперму серопозитивных быков-производителей [6]. Потенциальными переносчиками являются мокрецы *Culicoides pulicaris* и *Culicoides punctatus* [1].

Согласно техническому листу Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), вирус болезни Шмалленберга можно выявлять с помощью ОТ-ПЦР, выделения в культуре клеток (КК) насекомых (КС), почки сирийского хомяка (ВНК-21), почки африканской зеленой мартышки (*Vero*), а также с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и реакции нейтрализации (РН) [10].

Специалисты из Института им. Фридриха Леффлера (Германия) выделили данный вирус и адаптировали его для размножения в культуре клеток ВНК-21. Это позволило разработать тесты, основанные на реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и РН, которые используют для выявления антител к ВБШ.

На сегодняшний день данная вирусная инфекция является малоизученной. В связи с этим актуальным является изучение биологических свойств вируса, оптимизация методов его культивирования с целью выбора наиболее технологичных приемов конструирования средств диагностики и профилактики данного заболевания.

Целью настоящей работы было исследование возможности адаптации ВБШ к линиям перевиваемых КК

и определение степени накопления вируса в данных клеточных системах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали ВБШ изолят ВН80/11-4 под регистрационным номером RVB-1099, адаптированный к культуре клеток ВНК-СТ с титром 10^3 КИД₅₀/100 см², полученный из Института им. Фридриха Леффлера (Германия).

Для проведения исследований использовали перевиваемые КК: ВНК-21/13 (перевиваемая линия КК почки сирийского хомяка, *Beby hamster kidney cell*), *Vero* (перевиваемая линия КК почки африканской зеленой мартышки, *Cercopithecus aethiops*), ПС (перевиваемая линия КК почки сайги, *Saiga tatarica L.*), ПО (перевиваемая линия КК почки овцы, *Ovis aries L.*), Mark-145 (дериват клеточной линии MA-104 — почки эмбриона макаки, *Macaca mulatta*).

Чувствительность перевиваемых КК к ВБШ проводили методом последовательных пассажей. С этой целью монослойную КК заражали с адсорбцией вируса на клеточной мембране. Вирус вносили после удаления ростовой среды, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, а затем добавляли поддерживающую среду Игла или ПСП. Сбор вируса проводили при проявлении ЦПД на 80–90% площади монослоя. Полученный вирус хранили при температуре -80 °С.

Титрование ВБШ каждого пассажа проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах (Costar, Nunc, Denmark или их аналоги) в объеме 0,20 см³/луночка. Для этого, предварительно, в стерильных пенициллиновых флаконах готовили разведения вирусосодержащего материала на среде Игла (от 10^{-1} до 10^{-8}). Подготовленные разведения вируса переносили многоканальной пипеткой, начиная с наивысшего разведения, в культуральные планшеты по 0,05 см³, не меняя наконечников. Предварительно во все лунки планшета вносили по 0,05 см³ среды Игла. Затем к полученным разведениям вируса добавляли по 0,1 см³ клеточной суспензии *Vero* на среде Игла с содержанием 10% фетальной сыворотки КРС, с концентрацией клеток $0,4-0,5 \times 10^6$ кл/см³. Планшет закрывали крышкой, помещали в CO₂-инкубатор с содержанием 5% CO₂ при температуре 37 °С и вели наблюдения с использованием инвертируемого микроскопа. Заключительный учет результатов титрования вируса проводили через 48–72 ч инкубирования при условии сохранения целостности монослоя клеток в контрольных лунках.

Расчет инфекционной активности проводили по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³.

Для выявления генома ВБШ использовали ПЦР.

Рис. 1. Монослой 2-суточный незараженной культуры клеток ВНК-21

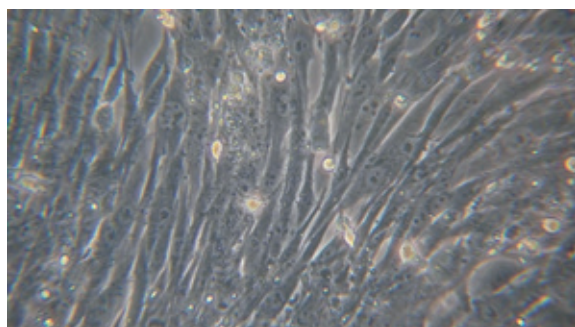


Рис. 2. Клетки монослоя культуры клеток ВНК-21 после инфицирования ВБШ через 24 ч

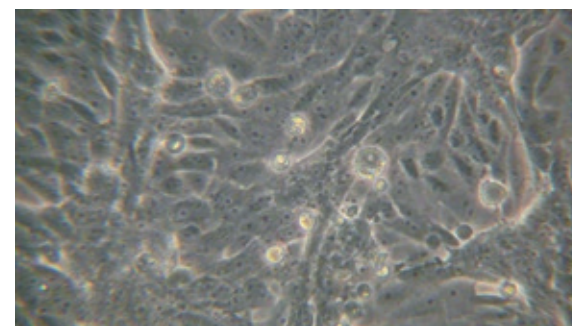
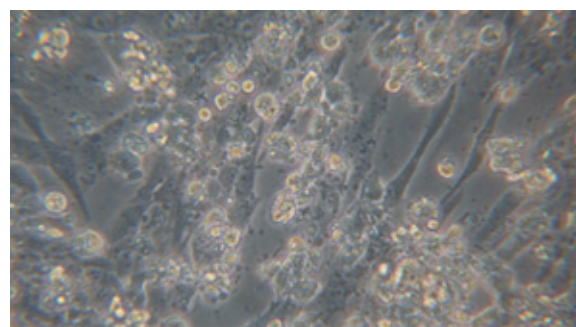


Рис. 3. Монослой 2-суточный незараженной культуры клеток Vero

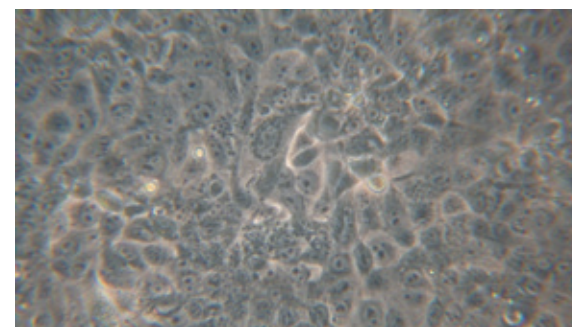


Рис. 5. Монослой 2-суточный незараженной культуры клеток ПС

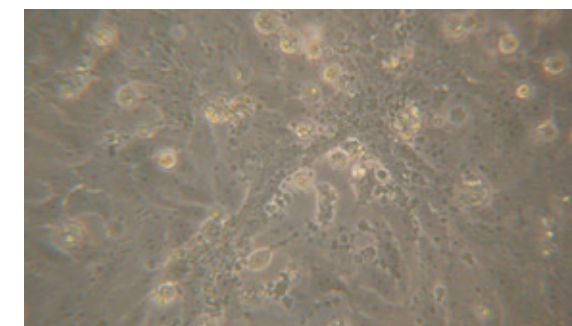


Рис. 4. Клетки монослоя культуры клеток Vero после инфицирования ВБШ через 48 ч

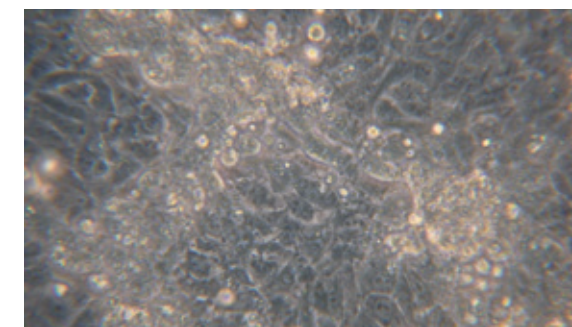


Рис. 6. Клетки монослоя культуры клеток ПС после инфицирования ВБШ через 48 ч

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено по 5 последовательных пассажей в перевиваемых клеточных линиях ВНК-21/13, ПС, *Vero*, ПО, Mark-145.

Динамика цитопатических изменений во всех КК была различна. Так, в КК ВНК-21/13 в 1 пассаже уже через 24 ч наблюдали округление клеток, в дальнейшем происходила их агрегация. К 48 ч культивирования практически большая часть клеток отслаивалась от стекла. С увеличением количества пассажей проявление ЦПД становилось более выраженным. К 3 пассажу наблюдали полное разрушение монослоя уже через 24 ч культивирования (рис. 1–2).

В КК *Vero* в 1–2 пассаже через 48–72 ч после инокуляции вируса отмечали образование псевдосинцития (слияние наружных мембран клеток), но в дальнейшем происходило округление клеток и слияние их в конгломераты. С увеличением количества пассажей время работы вируса сократилось до 48 ч (рис. 3–4).

Проявление ЦПД в КК ПС характеризовалось образованием агрегатов поражённых вирусом клеток. Через 72 ч культивирования большая часть клеток отслаивалась от стекла и деградировала до детрита, а неразрушенные поражённые клетки собирались в крупные конгломераты. Проведение каждого последующего пассажа приводило к усилению проявления ЦПД и сокращению времени культивирования вируса до 48 ч (рис. 5–6).

В КК ПО и Mark-145 ЦПД вируса было менее выраженным. На 4–5 пассаже изменения монослоя клеток не наблюдали, состояние клеточного монослоя было аналогично незараженным клеткам.

Сосуды с инфицированной КК каждого пассажа замораживали-оттаивали и проводили определение титра инфекционной активности вируса. Результаты представлены в таблице.

Из данных таблицы видно, что уровень накопления ВБШ в различных клеточных системах был неодинаков. Было отмечено, что при культивировании вируса на КК ВНК-21/13 наблюдали более четкое и раннее проявление ЦПД на 3–5 пассаже, приводящее к постепенному увеличению инфекционной активности до $4,88 \pm 0,22$ Ig ТЦД₅₀/см³.

Высокое накопление ВБШ наблюдали в КК ПС уже с 1 пассажа. Титр вируса на 1–5 пассаже составлял $4,00 \pm 0,08-4,80 \pm 0,14$ Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно.

Активность ВБШ в КК *Vero* находилась примерно на одном уровне во всех пяти пассажах и составляла $2,68 \pm 0,08-3,56 \pm 0,18$ Ig ТЦД₅₀/см³. Возможно, при подборе других параметров культивирования (рН, жесткость заражения, состав среды и т.д.) можно будет получить вирус с более высокой инфекционной активностью.

Культивирование ВБШ в КК ПО приводило к постепенному снижению активности вируса, и на 5 пассаже титр вируса в КК ПО составлял всего $1,25 \pm 0,03$ Ig ТЦД₅₀/см³.

При культивировании ВБШ в КК Mark-145 наблюдали минимальное накопление вируса ($1,05 \pm 0,33-1,16 \pm 0,25$ Ig ТЦД₅₀/см³), в 4–5 пассаже вирус обнаружен не был.

Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено, что наибольшее накопление ВБШ происходило в КК ВНК-21/13 и ПС. Титр вируса в КК ВНК-21/13 составлял $4,77 \pm 0,14-4,88 \pm 0,22$ Ig ТЦД₅₀/см³; время сбора урожая вируса через 24 ч, в КК ПС – $4,80 \pm 0,14-4,81 \pm 0,03$ Ig ТЦД₅₀/см³ через 48 ч инкубации. КК *Vero* была выбрана для проведения серологических исследований, в частности для постановки реакции микронейтрализации.

Таблица

Репродукция вируса болезни Шмалленберга в перевиваемых культурах клеток
n=3

Культура клеток	Номер пассажа	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД ₅₀ /см ³	Наличие генома вируса в ПЦР
ВНК-21/13	1	48	2,50±0,14	+
	2	48	3,33±0,29	+
	3	24–48	3,50±0,08	+
	4	24	4,77±0,14	+
	5	24	4,88±0,22	+
ПС	1	72	4,00±0,08	+
	2	48–72	4,63±0,14	+
	3	48	4,66±0,25	+
	4	48	4,81±0,03	+
	5	48	4,80±0,14	+
Vero	1	72	2,68±0,08	+
	2	72	3,41±0,25	+
	3	48–72	3,56±0,18	+
	4	48	3,53±0,29	+
	5	48	3,45±0,03	+
ПО	1	72–96	1,13±0,08	+
	2	72–96	1,56±0,25	+
	3	72	2,05±0,14	+
	4	72	1,62±0,29	+
	5	72	1,25±0,03	+
Mark-145	1	96	1,05±0,03	+
	2	96	1,16±0,25	+
	3	96	1,12±0,22	+
	4	96	н/о	+
	5	96	н/о	-

н/о — не обнаружено.

ВЫВОДЫ

1. Вирус болезни Шмалленберга был адаптирован в перевиваемых культурах клеток ВНК-21/13, ПС и Vero.
2. Наибольшее накопление вируса наблюдали в КК ВНК-21/13 и ПС. Титр вируса в КК ВНК-21/13 был на уровне 4,78±0,14–4,88±0,22 Ig ТЦД₅₀/см³, в КК ПС — 4,80±0,14–4,81±0,03 Ig ТЦД₅₀/см³. КК Vero была адаптирована для постановки реакции микронейтрализации.
3. Указанные линии культур клеток могут быть использованы при выборе чувствительных систем для культивирования данного возбудителя с целью получения активного вирусосодержащего материала.
4. Перевиваемые КК ПО и Mark-145 оказались непригодными для получения вирусной суспензии с высокой концентрацией вируса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина / А.В. Спрыгин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, В.А. Мищенко // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 6. — С. 24–34.
2. Мищенко В.А., Сухарев О.И., Макаров В.В. Болезнь Шмалленберга — новая вирусная инфекция жвачных // Ветеринарная практика. — 2012. — № 1 (56). — С. 5–7.

3. Роль вируса Шмалленберга в нарушении воспроизводства жвачных животных / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, В.В. Думова [и др.] // Ветеринария Кубани. — 2014. — № 2. — С. 3–6.
4. Шмалленбергвирусная болезнь жвачных / В.А. Мищенко, О.Ю. Черных, А.В. Мищенко, В.В. Думова // Ветеринарная патология. — 2012. — № 1. — С. 46–48.
5. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe / V. Doceul [et al.] // Veterinary Research. — 2013. — Vol. 44. — P. 31.
6. Gibbens N. Schmallenberg virus: a novel viral disease in northern Europe // Vet. Rec. — 2012. — Vol. 170, № 4. — P. 58.
7. Herder V. Characterization of Schmallenberg virus — induced pathology in aborted and neonatal ruminants. — Hannover: Department of Pathology; University of Veterinary Medicine. — 2013. — 62 p.
8. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011 / B. Hoffmann, M. Scheuch, D. Hoper [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 18. — P. 469–472.
9. Schmallenberg virus Infection among Red Deer, France, 2010–2012 / E. Laloy [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2014. — Vol. 20. — P. 131–134.
10. Schmallenberg virus / OIE. Technical Factsheet. — 2012. — URL: <http://www.oie.int/doc/ged/D13928.PDF>.

УДК 619:579.852.13:636.22/28

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛАКТИКИ НЕКРОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

С.И. Джупина

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

РЕЗЮМЕ

В последние десятилетия заболевание крупного рогатого скота некробактериозом стало серьезным тормозом на пути успешного развития молочного и мясного скотоводства. Все надежды на профилактику этой болезни, поскольку она инфекционная, сконцентрированы на деятельности ветеринарной науки и ветеринарных врачей. И они, руководствуясь принятым пониманием инфекционной патологии, прикладывают много усилий на разработку различных лекарственных препаратов для её лечения и специфической профилактики. Однако уровень заболеваемости продуктивных животных некробактериозом не только не сокращается, а даже с каждым годом все больше и больше возрастает.

Ключевые слова: некробактериоз крупного рогатого скота, мясное и молочное скотоводство, профилактика некробактериоза.

UDC 619:579.852.13:636.22/28

SPECIAL ASPECTS OF BOVINE NECROBACILLOSIS PREVENTION

S.I. Dzhupina

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

SUMMARY

In recent decades the contraction of necrobacillosis by cattle is a serious inhibitor on the way of successful development of dairy and beef raising. All hopes of the disease prevention, as the disease is infectious one, are focused on veterinary science and activities of veterinarians. Guided by the recognized insight into infectious pathology they make many efforts to develop different medicinal drugs for its treatment and specific prevention. However, the level of necrobacillosis incidence among production animals does not decrease but even more and more increases from year to year.

Key words: bovine necrobacillosis, beef and dairy raising, necrobacillosis prevention.

Ведущие ученые многих стран мира регулярно через каждые 2–3 года уже 17 раз обсуждали проблему роста заболеваемости крупного рогатого скота (КРС) некробактериозом на международных симпозиумах и конференциях. Названо 89 факторов риска, и все они находятся в сфере среды содержания животных. По мнению участников симпозиумов и конференций, эта среда создается для удобства человека, а не для комфорта животных [10]. Можно добавить, что много сделано для безопасности работы машин и механизмов, но в ущерб здоровью животных.

С целью предупреждения заболевания животных некробактериозом на конференциях и симпозиумах рекомендовали создавать для них «коровий комфорт» и описывали условия, которые его реализуют. По нашим многолетним наблюдениям, обследованиям вспышек и эпизоотологическим опытам постоянное содержание животных в условиях, обеспечивающих такой комфорт, позволяет предупреждать не только случаи заболевания животных некробактериозом, но и другими болезнями, какие сопровождают эту патологию. И все же на одном из последних симпозиумов, наверное, в унисон традиции ветеринарии, которая не только лечение больных, но и профилактику болезней связывает с применением различных препаратов, прозвучало, что «за прошедшие 20 лет мало что удалось сделать для решения проблемы хромоты продуктивных животных».

Не менее показательны признания отечественных исследователей [8]. Они подтвердили, что за 22 года исследований в нашей стране и за рубежом продолжается стабильный рост заболеваемости КРС хромотой и некробактериозом, несмотря на наличие широкого ассортимента лечебно-профилактических препаратов. И в этой же статье её авторы утверждают, что «в период проведения плановой вакцинопрофилактики некробактериоза с помощью формол-эмульсионной вакцины отмечается стойкое благополучие хозяйств, и новых случаев возникновения болезни копытца инфекционной этиологии не наблюдается».

Наверное, в этом случае надо обстоятельно разобраться с понятиями «профилактика болезни» и «лечение больных». Если применение вакцины столь эффективно, то заболеваемость должна сокращаться так, как это произошло с сибирской язвой, стригущим лишаем и другими подобными болезнями. Но такого не происходит. Судя по тексту статьи, авторы располагают действительно эффективным лечебным препаратом — фузобаксаном. Но это все же лечебный, а не профилактический препарат, даже если он эффективен на ранних стадиях болезни.

Все это убедительно доказывает, что проводимые против этой болезни профилактические мероприятия не адекватные её эпизоотическому процессу. Чтобы понять, какой должна быть профилактика некробактериоза, надо еще раз напомнить причину заболевания КРС этой болезнью и её отличительные особенности от классических инфекционных болезней.

Рациональная эпизоотологическая классификация болезней животных [3] относит некробактериоз к категории факторных инфекционных болезней, эпизоотическому процессу которых не свойственна эстафетная передача возбудителя инфекции. Только это подчеркивает, что меры контроля над проявлением его эпизоотического процесса существенно отличаются от тех мер, какие весьма эффективно предупреждают

появление и распространение болезней, возбудители которых проникают к животным горизонтальным путем извне.

Проблема профилактики некробактериоза КРС успешно решается с помощью понимания эпизоотического процесса этой инфекционной болезни, адекватно его естественному течению. Такое понимание стало возможным после проведения фундаментальных исследований некробактериоза [11].

Рассмотрим особенности этого процесса. Хорошо известно, что возбудителем некробактериоза является *Fusobacterium necrophorum*, большое количество которого закономерно живёт в желудочно-кишечном тракте жвачных животных, способствуя организму в расщеплении и усваивании грубых кормов. Чтобы выполнять такую функцию, в их желудочно-кишечном тракте постоянно ведут активный образ жизни миллиарды таких микробов. К сожалению, ветеринария не располагает данными, какой удельный вес занимают энтеральные микробы по отношению к весу животного, в котором они закономерно живут. Хотя академик А.А. Воробьев уже показал, что к весу человека их удельный вес достигает 2%.

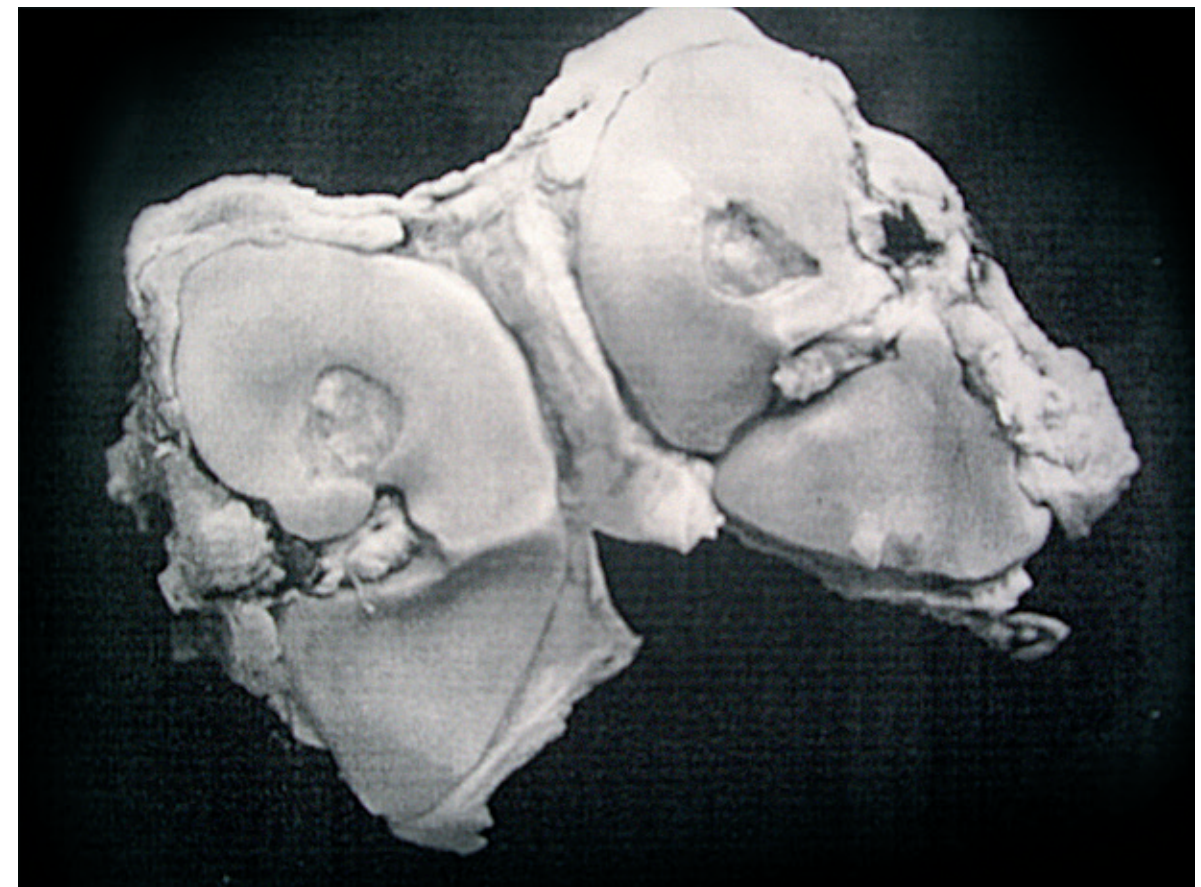
Таким образом, резервуаром возбудителя некробактериоза является желудочно-кишечный тракт жвачных животных. Это подтверждается и массовым рассеиванием микроорганизма в местах содержания животных этого вида, которое совершенно безобидно при нормальном состоянии здоровья животных.

Но если животное травмирует нижнюю часть конечности, то в рану из мест его содержания свободно проникает возбудитель некробактериоза и своей жизнедеятельностью в анаэробных условиях подкожных тканей формирует некротический очаг [6]. Такая ситуация хорошо известна ветеринарным врачам, практикующим в животноводческих хозяйствах. И у них не возникает мысль профилактить эту патологию с помощью вакцинации животных.

Разумеется, фенотипические и генотипические признаки возбудителя некробактериоза в желудочно-кишечном тракте и анаэробных условиях подкожных тканей несколько отличаются. Но это не значит, что для профилактики этой патологии необходимо конструировать и использовать вакцины, а также научиться выявлять и оценивать структуру активных участков ДНК микроорганизмов [1]. Вполне достаточно для профилактики этой патологии создавать такие условия содержания животных, при которых исключались бы любые травматические воздействия на них. Единичные случаи такого заболевания решаются профессиональным вмешательством ветеринарного врача.

Так предупреждают случаи заболевания жвачных животных травматическим некробактериозом. Но ветеринарную общественность и владельцев продуктивного скота беспокоит ситуация, когда патологию регистрируют у большого числа животных, а травмы у них вообще не просматриваются. Их беспокоит эпизоотический некробактериоз.

Эпизоотологические наблюдения, обследования и опыты показали, что пусковой механизм эпизоотического процесса такого варианта некробактериоза аналогичен пусковому механизму травматического некробактериоза. Фактором, порождающим эти инфекционные болезни, и пусковым механизмом эпизоотического процесса являются дефекты кожного покрова. Но пусковой механизм эпизоотического процесса не-



Узуры, или места на гиалиновой поверхности суставов, из которых изъят кальций (фото А.А. Самоловова)

кробактериоза КРС порождают не травмы, а потеря кожного покрова естественной непроницаемости как неспецифического фактора защиты. Через кожу, потерявшую непроницаемость, энтеральная и накожная микрофлора свободно проникает в анаэробные условия подкожных тканей из мест содержания животных. И если в анаэробных условиях подкожных тканей возбудитель некробактериоза формирует некротический процесс, то представители другой микрофлоры — различные абсцессы и фурункулы.

Пониманию пускового механизма эпизоотического процесса некробактериоза КРС способствуют знания особенностей функционирования в организме желез системы эндокринной секреции [4, 9] и общего состояния здоровья. Известно, что железы этой системы, ответственные за усвоение из кормов минеральных и витаминных веществ и снабжение ими сыворотки крови и соответствующих органов, расположены в толще стенки тонкого отдела кишечника. При достаточном количестве грубых кормов в рационе жвачных животных эти железы нормально функционируют и обеспечивают сыворотку крови кальцием и другими минеральными и витаминными веществами. Если же тонкий отдел кишечника воспалён, то железы не воспринимают этих веществ из кормового рациона, и они выделяются с экскрементами во внешнюю среду. В таких условиях нарушается витаминно-минеральное обеспечение организма животного, и он вынужден поставлять эти вещества в сыворотку крови за счет изъятия их из кожи, суставов, костей. При этом кожный покров теряет естественную непроницаемость.

Следовательно, изучение пускового механизма эпизоотического процесса некробактериоза надо начинать с выяснения причин потери кожного покрова естественной непроницаемости, которая зависит от уровня обеспеченности организма животных кальцием. В сыворотке крови здорового животного он поддерживается на уровне 10–20 мг/%. Его обмен регулируют два гормона: паратгормон, синтезируемый паращитовидной железой, и кальцитонин, синтезируемый щитовидной железой. Кальцитонин обеспечивает поддержание уровня кальция в сыворотке крови за счет поступления из кормов. Его восприятию способствует гормонально активная форма витамина D₃.

Если кормовой рацион не обеспечивает достаточного количества кальция, или когда его из корма не воспринимают железы эндокринной секреции по причине воспаления тонкого отдела кишечника, то паращитовидная железа начинает синтезировать паратгормон. Он поддерживает содержание этого минерального вещества в сыворотке крови за счет высвобождения его из кожи, хрящей и костной ткани. Этот процесс определяется как остеолизис, который характеризуется размягчением хвостовых позвонков и образованием на гиалиновой поверхности суставов узур, или мест, из которых изъят кальций. Узур показаны на фото.

Соответственно, регулирование витаминно-минерального обмена, определяющего уровень естественной непроницаемости кожного покрова, степень минерализации хрящей и костной ткани в организме жвачных животных осуществляется взаимодействием

кальцитонина, паратормона и гормонально активной формы витамина D₃.

К сожалению, мы не располагаем клиническими или лабораторными методами, с помощью которых можно было бы оценивать степень непроницаемости кожного покрова и устанавливать тот критический уровень, при котором этот покров её теряет. Следует только напомнить, что повышенная влажность в месте расположения конечностей жвачных животных увеличивает вероятность потери кожным покровом естественной непроницаемости.

Но каждому ветеринарному врачу доступны косвенные, весьма убедительные критерии, позволяющие оценивать заниженный уровень минерально-витаминного обмена, чтобы принимать меры для его нормализации. Таким критерием является заметное ослабление жвачки и атония преджелудков, а также катаральное или серозно-катаральное воспаление тонкого отдела кишечника. Ослабление жвачки и атония преджелудков хорошо просматриваются при клиническом осмотре животных. Воспаление тонкого отдела кишечника нетрудно установить при разделке туш убитых животных или при вскрытии трупов.

Есть основание полагать, что уровень воспаления тонкого отдела кишечника коррелирует с понижением уровня кислотности железистого желудка. При таком воспалении тонкого отдела кишечника кислотность желудка снижается от физиологически нормального рН 6,8–7,4 до 5,9 и ниже.

Вторым, не менее убедительным критерием нарушения минерально-витаминного обмена является оценка гиалиновой поверхности путового, карпального и других суставов. К сожалению, при разделке туш и вскрытии трупов животных ветеринарные врачи редко обращают внимание на степень поражения гиалиновой поверхности суставов. Но наличие на их поверхности узур в сочетании даже с незначительным воспалением тонкого отдела кишечника убедительно говорит о глубоком нарушении витаминно-минерального обмена и является верным показателем неизбежности возникновения предшествующих признаков и заболевания животных некробактериозом и другими болезнями конечностей. Уместно напомнить, что надзор над этой патологией с целью диагностики болезней конечностей нельзя ограничивать просмотром единичных животных.

Рассматривая причины и пусковой механизм эпизоотического процесса этой инфекционной болезни, надо знать причины хронического воспаления тонкого отдела кишечника. Эта патология в современных условиях распространена довольно широко. Она является причиной болезненного состояния конечностей, предрасположенности к заболеванию маститами, эндометритом и другими факторными инфекционными болезнями. Высшей формой проявления этой патологии является некробактериоз, фурункулез, абсцессы.

Имеется много причин хронического воспаления тонкого отдела кишечника. Основной из них является несоответствие кормов естественному сформировавшемуся функционированию четырехкамерного желудка и кишечного тракта жвачных животных. Система пищеварения жвачных животных рассчитана на восприятие и переработку больших объемов грубых кормов. Заниженный объем в рационе грубых кормов и замена их большим объемом концентратов и кислых кормов неизбежно ведёт к серозно-катаральному и катаральному воспалению тонкого отдела кишечника.

Соответственно, первостепенными действиями ветеринарного врача в такой ситуации должно быть требование к владельцам животных ежедневно вводить в рацион не менее 8–9 кг качественного лугового сена, обогащенного люцерной, и исключить из него кислые корма и концентраты. Балансирование рациона кормления жвачных животных по питательным веществам надо решать за счет бобовых трав (люцерны). Силос и концентраты жвачным животным допустимо использовать в небольших объемах, только как подкормку в сочетании с грубыми кормами.

Резервуаром возбудителя некробактериоза является желудочно-кишечный тракт жвачных животных, а функцию фактора его передачи выполняют полы в животноводческих помещениях и территории ферм, прилежащие к этим помещениям.

Важно отметить, что эпизоотический процесс некробактериоза формируется не в результате проникновения возбудителя инфекции от больных к здоровым животным, как это имеет место при классических инфекционных болезнях, а от предметов внешней среды через кожу, потерявшую естественную непроницаемость, в анаэробные условия подкожных тканей. Заболевают только те животные, у которых потеряна такая непроницаемость.

Соответственно, надо учитывать, что потребность кальция в организме жвачных животных и вероятность сокращения уровня непроницаемости их кожного покрова возрастает прежде всего у глубоко стельных коров, поскольку они потребляют много кальция для формирования плода. Не в меньшей степени такая вероятность возрастает у высокоудойных коров, поскольку они потребляют много кальция на формирование молочной продукции. В такой же степени снижается естественная непроницаемость кожного покрова у молодых растущих животных, поскольку они потребляют много кальция на формирование костной ткани, хрящей и кожи.

Диагноз некробактериоз устанавливают на основе клинического проявления хромоты и характерного некротического поражения нижней части конечностей. Чаще такое поражение отмечают на задних конечностях, поскольку их увлажнение способствует проникновению энтеральной микрофлоры в подкожные ткани через кожный покров, потерявший непроницаемость. Признаками, предшествующими клиническому проявлению этой болезни, является болезненность суставов.

Для ранней диагностики некробактериоза и установления причин, порождающих эту болезнь, проводят вынужденный убой 2–3 животных с клиническими признаками, дающими основание предполагать развитие этой болезни, и изучают состояние тонкого отдела кишечника и гиалиновой поверхности суставов нижней части конечностей. Желательно такой ветеринарный осмотр проводить во всех случаях поставки скота для реализации на мясо.

Если причиной такой патологии был дефицит кальция в кормах, то его компенсируют обогащением рациона животных минеральными подкормками (мел, трикальцийфосфат, бикальцийфосфат и др.). Надо отметить, что патология, порождённая дефицитом кальция в кормовом рационе, в современных условиях встречается сравнительно редко.

Намного чаще дефицит кальция в сыворотке крови встречается в том случае, когда его не воспринимают из кормового рациона железы эндокринной секреции.

Это происходит при воспалении тонкого отдела кишечника. При этом нарушается и нормальное функционирование гормонально активной формы витамина D₃.

Некротический очаг в подкожных тканях жвачных животных формируют те же микроорганизмы, которые в желудочно-кишечном тракте способствуют расщеплению и усвоению грубых кормов. Для этого им не требуется приобретать какие-то мифические эпизоотические свойства и повышенную вирулентность. Как и при травматическом некробактериозе, не требуется становления эпизоотического варианта этого возбудителя инфекции.

Болезнетворные свойства этих микроорганизмов проявляются только потому, что они попадают в не свойственные условия, и эти условия оказались подходящими для их жизнедеятельности.

Инфекционный процесс и патогенез некробактериоза КРС изучены достаточно полно для того, чтобы конструировать средства специфической профилактики. Но усилия в этом направлении не дали желаемого эффекта. Еще на заре бактериологических исследований установлено, что против некробактериоза не удаётся получить выраженного иммунитета [5]. Широкомасштабная проверка нескольких вакцин убедительно подтвердила, что специфическая профилактика этой инфекционной болезни не эффективна [2]. Проанализировав патогенез болезни, ряд исследователей считает, что «не может быть никакой речи о вакцинации животных против некробактериоза» [10].

Однако работы по конструированию и использованию препаратов для профилактики некробактериоза КРС продолжают выполнять на самом высоком научном и методологическом уровне. Авторы таких вакцин продолжают рекомендовать их для применения. Но эпизоотическая ситуация на современных животноводческих фермах упорно подтверждает, что их использование не оказывает влияния на эпизоотический процесс этой инфекционной болезни.

Такая ситуация объясняется тем, что возбудитель некробактериоза в процессе совместной эволюции (коэволюции) с КРС адаптировался к закономерной жизнедеятельности в его желудочно-кишечном тракте. В свою очередь, у животных сформировалась толерантность к такой жизнедеятельности, и он стал облигатным хозяином возбудителя некробактериоза. Безусловно, этот возбудитель продолжает характеризоваться признаками генетической чужеродности [7]. Но постоянная закономерная жизнедеятельность в желудочно-кишечном тракте КРС оказывала влияние на центральный биологический механизм иммунитета жвачных животных, в результате чего заметно уменьшалась его способность образовывать антитела.

Такое уменьшение обусловлено тем, что в процессе коэволюции возбудителя некробактериоза с облигатным хозяином центральный биологический механизм иммунитета все в большей и большей степени затруднялся распознавать «чужое» и отличать его от «своего». Для этого механизма образовывались помехи выполнять свою функцию и вырабатывать защитные вещества (антитела) по силе иммунного ответа, адекватные потенциальной силе болезнетворного действия постоянно живущих в нём возбудителей инфекций. Хотя признаки генетической чужеродности возбудителя инфекции всегда стимулировали выработку иммунобиологических реакций.

Полностью устранить из практики эксплуатации продуктивных животных случаи заболевания некробактериозом жвачных животных позволяет профессиональный систематический надзор над состоянием тонкого отдела кишечника и гиалиновой поверхности суставов КРС. Благополучие по этой инфекционной болезни обеспечивается не традиционными для ветеринарии препаратами, а знанием её эпизоотического процесса и профессиональным воздействием на него. Такому благополучию способствует сбалансированный рацион, лишённый фактора риска заболевания кишечника, и содержание животных в сухих помещениях с обязательной возможностью солнечной инсоляции. Благополучию способствует и постоянная популяризация знаний, что жвачные животные нуждаются в потреблении больших объемов грубых кормов, а концентраты в чистом виде являются причиной заболевания желудочно-кишечного тракта.

Суть проблемы профилактики этой инфекционной болезни заключается не в наличии налаженной системы микробиологического и иммунологического слежения, а в знании особенностей её эпизоотического процесса, адекватных его естественному течению, и умении ими пользоваться.

Отечественные и зарубежные исследователи в результате длительного изучения некробактериоза пришли, в общем, к однозначным выводам. Одни считают, что «решение проблемы целиком и полностью находится в ведении владельцев скота» [10]. По мнению других, устранить факторы, порождающие некробактериоз, «можно только совместными усилиями всех специалистов сельхозпредприятия, т.к. они связаны вопросами организации кормления, эксплуатации и содержания животных, являющимися общехозяйственными» [8]. Нетрудно усмотреть, что отмеченные исследователи ориентируют на ликвидацию уже свершившейся вспышки, на лечение больных животных. Они, как и владельцы скота, врачи ветеринарной медицины и все специалисты сельхозпредприятий, воспринимают проблему, когда она уже проявилась.

Задача же заключается в том, чтобы не допускать случаев заболевания продуктивных животных этой тяжелой факторной инфекционной болезнью, причиняющей большой урон народному хозяйству. Решить эту задачу может только государственный ветеринарный инспектор в содружестве с ветеринарным врачом, обслуживающим продуктивных животных. Они должны владеть знаниями о причинах появления и распространения инфекционных болезней, в т.ч. и некробактериоза, и о мерах их предупреждения. И именно государственный ветеринарный инспектор должен указывать владельцам и всем специалистам сельхозпредприятий, какими должны быть их хозяйственные мероприятия, чтобы обеспечить профилактику таких болезней как некробактериоз. А эти мероприятия сводятся к кормлению жвачных животных достаточным объемом грубых кормов, не допуская злоупотреблений концентратами и силосом, предоставлению для них достаточной площади для отдыха и нормальной жизнедеятельности, своевременной заготовке, хранению и использованию в сухом состоянии обильного количества соломенной подстилки.

В местах вспышек некробактериоза эти мероприятия не соблюдаются. Так может продолжаться до тех пор, пока ветеринарные врачи не предъявят жестких требований к владельцам животных четко выполнять

эти мероприятия и не откажутся от надежд на вакцины, которые только отвлекают владельцев продуктивных животных от проведения эффективных профилактических мер.

Случаи заболевания животных некробактериозом предупреждают не с помощью различных препаратов, а с помощью знаний эпизоотического процесса этой инфекционной болезни. Прежде всего учитывают резервуары и факторы передачи возбудителя инфекции, пути и механизмы, по которым он передаётся, пусковой механизм и движущую силу эпизоотического процесса. Разумеется, очень важно уметь использовать эти знания и применять их в конкретных хозяйственных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков В.Д., Каминский Г.Д. Скрытые пружины эпидемий и профилактика будущего // Гипотезы. Прогнозы (Будущее науки): международный вестник. — М.: Знание, 1988. — С. 172–184.
2. Джупина С.И. Причины заболеваемости и профилактика некробактериоза // Ветеринария. — 2005. — № 7. — С. 7–10.
3. Джупина С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней с.-х. живот-

ных // Вестник Российской академии с.-х. науки. — 2001. — № 2. — С. 71–75.

4. Држевецкая И.А. Основы физиологии и обмена веществ и эндокринной системы. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Высшая школа, 1983. — 272 с.

5. Коваленко Я.Р. Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных. — М.: Сельхозгиз, 1954. — 360 с.

6. Лукьяновский В.А. Биотехнологические закономерности возникновения ортопедических болезней у коров // Ветеринария. — 1997. — № 10. — С. 35–41.

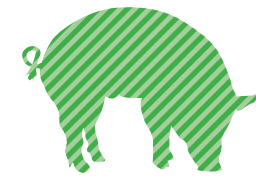
7. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1987. — 416 с.

8. Пути оздоровления хозяйств от болезней пальцев, копытцев и некробактериоза / Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев, К.Х. Попуниди [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2013. — № 4 (7). — С. 22–27.

9. Розен В.В. Основы эндокринологии. — М.: Высшая школа, 1989. — С. 305–308.

10. Самоловов А.А., Лопатин С.В. Хромота — отражение системных метаболических болезней молочного рогатого скота // Инновации и продовольственная безопасность. — 2014. — № 2. — С. 76–80.

11. Самоловов А.А. Некробактериоз крупного рогатого скота. — Новосибирск, 1998. — 139 с.



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *E. COLI* ГЕНОВ K205R И B602L ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

А.В. Щербаков¹, А.С. Яковлева², А.М. Тимина³, М.Р. Якупов⁴

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

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

³ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

РЕЗЮМЕ

Проведено молекулярное клонирование генов K205R и B602L вируса африканской чумы свиней в *E. coli*. Отработаны условия экспрессии и очистки, обеспечивающие высокий выход рекомбинантных белков. Очистку растворенных рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии с применением Ni-NTA-agarose («Qiagen»). Рекомбинантные антигены биологически безопасны, более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,5 мг для рK205R и 2 мг для рB602L.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, рекомбинантные белки рK205R и рB602L, экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожи и обширными геморрагиями во внутренних органах. Для АЧС характерно многообразие форм течения болезни: от сверхострой и острой со 100% летальностью до хронической.

АЧС эндемична в Африке, Сардинии (Италия), а с 2007 г. в Закавказье и Российской Федерации. Экономический ущерб, наносимый африканской чумой свиней, складывается из прямых потерь по радикальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется десятками миллионов долларов.

Возбудитель африканской чумы свиней — крупный оболочечный вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Геном вируса АЧС, представленный двухцепоч-

ечной ДНК длиной 170–192 тысячи пар нуклеотидов, кодирует до 150 белков. Из них не менее 28 являются структурными [3].

В связи с тем, что эффективные и безопасные вакцины против АЧС не разработаны, борьба с болезнью ведется путем ее диагностики и ликвидации очагов заболевания.

Лабораторная диагностика АЧС основана на выявлении возбудителя болезни или антител к нему в крови и органах инфицированных животных. Методы прямого обнаружения вируса (выделение в культуре клеток, РПИФ, ПЦР) являются приоритетными для диагностики сверхострых и острых форм АЧС. Серологические методы предпочтительны для диагностики подострых и хронических форм болезни, обнаружение антител

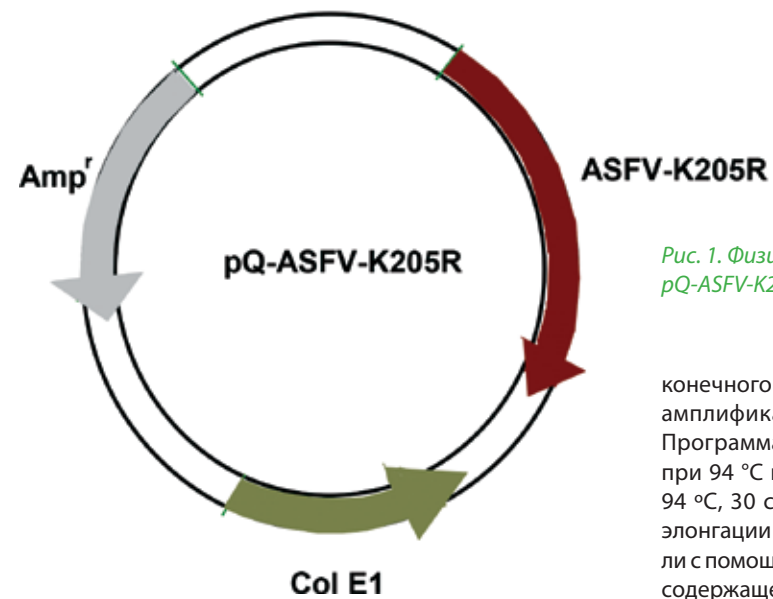


Рис. 1. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pQ-ASFV-K205R

конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили в ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Программа включала 3 мин начальной денатурации при 94 °С и 35 циклов ПЦР: 30 сек. денатурации при 94 °С, 30 сек. отжига праймеров при 55 °С и 40 сек. элонгации при 72 °С. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Молекулярное клонирование генов K205R и B602L осуществляли по общепринятым методикам [1].

Экспрессия рекомбинантных белков. Культивирование *E. coli* проводили в орбитальном шейкере при 150 об/мин и 37 °С. В дневную культуру клеток, достигшую логарифмической фазы роста, добавляли индуктор IPTG (Promega, США). Уровень экспрессии и размер рекомбинантных белков определяли с помощью электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гены K205R и B602L амплифицировали методом ПЦР, используя ДНК российского изолята вируса АЧС. В реакции применяли праймеры, содержащие сайты рестрикции Bam HI и Hind III. После обработки соответствующими рестриктазами ампликоны клонировали в экспрессирующий плазмидный вектор под T5-промотор. Физические карты рекомбинантных плазмид представлена на рис. 1 и 2.

В результате трансформации рекомбинантными плазмидами компетентных клеток JM109 *E. coli* получили клоны, экспрессирующие рекомбинантные белки rK205R и rB602L вируса АЧС. Молекулярный вес рекомбинантных белков соответствовал расчетному (рис. 3, треки 1 и 3).

С целью повышения уровня накопления рекомбинантных белков в клетках *E. coli* были проведены эксперименты по оптимизации условий экспрессии. Оптимизацию проводили по двум параметрам: концентрации индуктора (ИПТГ) и времени экспрессии.

Влияние концентрации индуктора на уровень экспрессии изучали в диапазоне от 0,01 до 2 мМ. Уровень экспрессии белков определяли визуально по электрофореграмме. Накопление рекомбинантных белков rK205R и rB602L достигало максимума при концентрации ИПТГ 0,5 мМ и при дальнейшем повышении концентрации индуктора не менялось.

Полученные результаты позволили установить, что концентрация ИПТГ 0,5 мМ является достаточной для экспрессии рекомбинантных белков rK205R и rB602L, и все дальнейшие эксперименты по экспрессии проводились с использованием этой концентрации индуктора.

После определения оптимальной концентрации индуктора исследовали кинетику экспрессии белков.

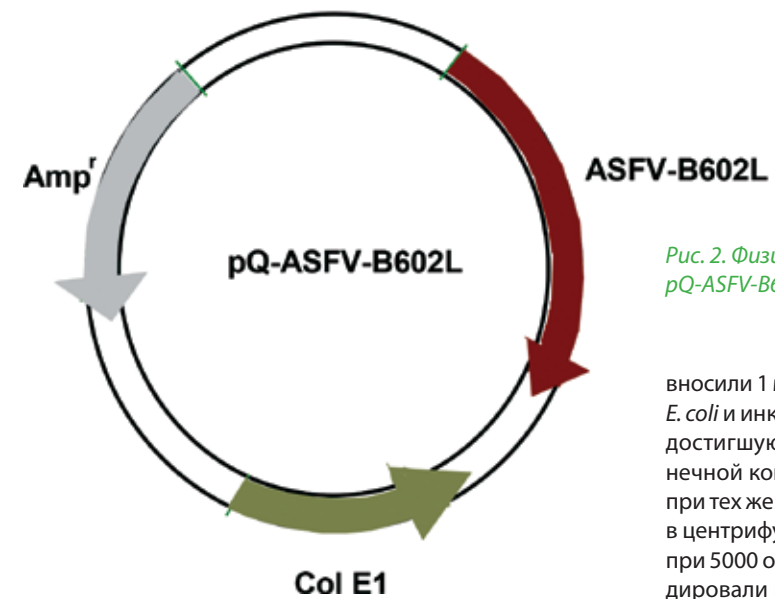


Рис. 2. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pQ-ASFV-B602L

Для этого аликвоты дневной культуры отбирали через 0,25; 0,5; 1; 2; 4 и 18 ч после индукции и анализировали в 12%-ном полиакриламидном геле. Было обнаружено, что белки являются относительно стабильными, поскольку даже после 18 ч экспрессии не наблюдалось их протеолиза. Накопление белков rK205R и rB602L достигало максимума через 4 ч после индукции и далее не менялось, поэтому все последующие эксперименты проводились именно с таким временным режимом.

Следующий этап исследований заключался в отработке условий очистки и концентрирования белков rK205R и rB602L. Рекомбинантные белки содержали на N-конце шесть остатков гистидина. Это позволяло проводить очистку rK205R и rB602L методом металл-хелатной хроматографии. В связи с тем, что рекомбинантные белки накапливались в клетках *E. coli* в нерастворимой форме, их очистку проводили в денатурирующих условиях.

При использовании в качестве денатурирующего агента 8М мочевины в раствор переходила лишь незначительная часть рекомбинантных белков, большая же часть их при центрифугировании выпадала в осадок вместе с клеточным дебрисом. С помощью 6М гуанидин хлорида белки rK205R и rB602L растворялись в гуанидин хлориде значительно лучше, чем в мочеvine. В связи с этим 6М гуанидин хлорид был включен в состав буфера для лизиса клеток и промывки.

Очистку растворенных рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии с применением Ni-NTA-agarose (Qiagen). Рекомендуемые фирмой-изготовителем сорбента условия элюции рекомбинантных белков оказались непригодными, поскольку белки не снимались с сорбента при использовании стандартных условий: низких значений pH или 0,2М имидазола. Лишь при повышении концентрации имидазола в элюирующем буфере до 0,4М удалось добиться элюции большей части каждого из белков. Дальнейшее повышение концентрации имидазола в элюирующем буфере не повлияло на выход белков в элюате. Таким образом, оптимальным условием элюирования белков являлось использование 0,4М раствора имидазола.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема экспрессии и очистки рекомбинантных белков rK205R и rB602L. В колбу со 100 мл среды LB, содержащей 100 мг/мл ампициллина,

вносили 1 мл ночной культуры рекомбинантного клона *E. coli* и инкубировали при 170 об/мин, 37 °С. В культуру, достигшую плотности $OD_{600}=0,5$, вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали еще 4 ч при тех же условиях. Культуру клеток *E. coli* переносили в центрифужные стаканы и осаждали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Надосадок удаляли, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего/промывочного раствора (6М гуанидин гидрохлорид, 0,1М NaH_2PO_4 , 0,01М Трис-НCl, pH 8,0) и перемешивали в течение 30 мин. Лизат центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g. Осадок удаляли, к надосадку добавляли 1 мл сорбента (Ni-NTA агароза) и перемешивали в течение 15 мин, после чего суспензию центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g. Надосадок сливали, осадок дважды промывали 10 мл лизирующего/промывочного раствора. Для элюции рекомбинантного белка к осадку добавляли 1 мл элюирующего раствора (0,4М имидазол, 0,1М NaH_2PO_4 , 0,01 мМ Трис-НCl, pH 8,0), перемешивали в течение 1 мин, после чего центрифугировали течение 1 мин при 12000 g. Надосадок содержал очищенный рекомбинантный белок. Для оценки степени очистки и концентрации рекомбинантных белков проводили электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли.

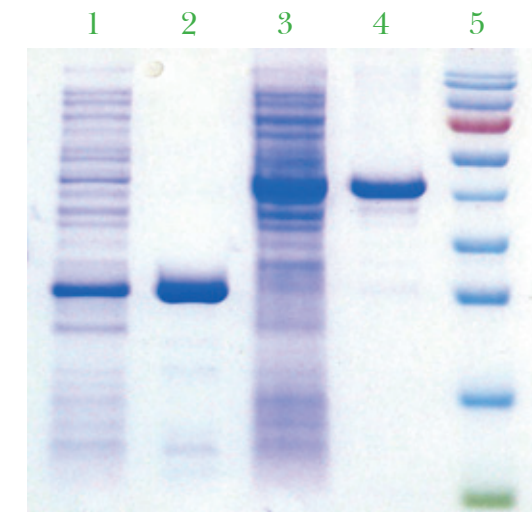


Рис. 3. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков rK205R и rB602L вируса АЧС, анализ в 12%-ном полиакриламидном геле

1 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантного белка rK205R; 2 — очищенный препарат рекомбинантного белка rK205R; 3 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантного белка rB602L; 4 — очищенный препарат рекомбинантного белка rB602L; 5 — маркер молекулярной массы белков (170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10 кДа).

к вирусу АЧС является основным способом выявления животных, инфицированных низковирулентными штаммами [2].

В качестве основного метода серологической диагностики АЧС Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует иммуноферментный анализ. В иммуноферментном анализе, рекомендованном МЭБ (далее МЭБ-ИФА), в качестве антигена используются частично очищенные препараты белков вируса АЧС, выращенного в культуре клеток MS [6]. Получение такого антигена трудно стандартизировать, и оно связано с биологическими рисками. Кроме того, при высокой чувствительности МЭБ-ИФА его специфичность относительно невысока [4].

В связи с этим активно ведутся исследования по получению и использованию в серодиагностике АЧС рекомбинантных антигенов. Рекомбинантные антигены биологически безопасны, более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. К настоящему времени описано применение в серодиагностике АЧС нескольких рекомбинантных белков: p54 [7, 8], p30 [9, 11], pp62 [5], p10, p72, pA104R, pC44L, pCP312R [12]. В 2009 г С. Gallardo и соавт. показали, что перспективными антигенами для серодиагностики АЧС являются рекомбинантные белки rK205R и rB602L. ИФА с применением этих рекомбинантных антигенов отличался высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней [10].

Цель работы состояла в том, чтобы экспрессией в *E. coli* получить рекомбинантные белки rK205R и rB602L и отработать условия их экспрессии и очистки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. Для молекулярного клонирования генов K205R и B602L использовали изолят Оренбург-2008 вируса АЧС.

Выделение вирусной ДНК осуществляли с использованием 6М гуанидин тиоцианата и стекловолокнистых фильтров GF/F.

ПЦР. Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10 × буфера для ПЦР, 3 мМ Mg^{2+} , 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 20 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до

С применением описанной технологии удалось получить очищенные препараты рекомбинантных белков с высокой концентрацией. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,5 мг для рK205R и 2 мг для рB602L (рис. 3, треки 2 и 4).

На основе полученных рекомбинантных антигенов планируется разработать непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

ВЫВОДЫ

Проведено молекулярное клонирование генов K205R и B602L вируса АЧС. Получены клоны *E. coli*, экспрессирующие рекомбинантные белки рK205R и рB602. Отработаны условия экспрессии и очистки, обеспечивающие высокий выход очищенных препаратов рекомбинантных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М: Мир, 1984. — 480 с.
2. African swine fever // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — 2012. — Vol. 2, Chap. 2.8.1. — URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (дата обращения: 01.10.14).
3. African swine fever / J.M. Sanchez-Vizcaino, B. Straw, S. D'Alaire, W. Mengeling // Diseases of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. 9th ed. — Ames, Iowa, 2006. — P. 291–298.
4. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubilos, S. Gomez, N. Moreno [et al.] // Virus Res. — 2013. — Vol. 173. — P. 159–167.
5. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect

cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodriguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 950–956.

6. Escribano J.M., Pastor M.J., Sanchez Vizcaino J.M. Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever // Am. J. Vet. Res. — 1989. — Vol. 50. — P. 1118–1122.

7. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodriguez, P. Gomez-Puertas [et al.] // J. Virol. Meth. — 1997. — Vol. 64. — P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C. Alcaraz, F. Rodriguez, J. Oviedo [et al.] // J. Virol. Meth. — 1995. — Vol. 52. — P. 111–119.

9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced on *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Perez-Filgueira, F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 3114–3121.

10. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2009. — Vol. 16. — P. 1012–1020.

11. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Meth. — 2000. — Vol. 89. — P. 129–136.

12. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88. — P. 2426–2434.

CLONING AND EXPRESSION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS K205R AND B602L GENES IN *E. COLI*

A.V. Scherbakov¹, A.S. Yakovleva², A.M. Timina³, M.R. Yakupov⁴

¹ Leading Scientist, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

² Senior Scientist, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Senior Scientist, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁴ Postgraduate, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

A molecular cloning of African swine fever virus k205r and b602l genes in *E. coli* was carried out. The expression and purification conditions ensuring high yield of recombinant proteins were optimized. Dissolved recombinant proteins were purified by metal-chelate affinity chromatography using Ni-NTA-agarose («Qiagen»). Recombinant antigens are biologically safe, easier to prepare and ensure higher ELISA specificity. The purified protein yield from 100 ml of *E. coli* culture was 1,5 mg for pK205R and 2 mg for pB602L.

Key words: African swine fever virus, pK205R and pB602L recombinant proteins, expression.

INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a viral disease of pigs characterized by fever, skin cyanosis and extensive hemorrhages in internal organs. ASF is also characterized by various forms; from a peracute and acute with 100% mortality to a chronic form.

ASF is endemic in Africa, Sardinia (Italy) and starting from 2007 in Transcaucasia and the Russian Federation. Economic losses caused by African swine fever are associated with both measures taken to eradicate the disease and restrictions in international trade and worth tens of millions of U.S. dollars.

ASF agent is a large enveloped virus from *Asfivirus* family, *Asfivirus* genus. ASF virus contains a double-stranded DNA genome of 170 to 192 kbp which codes up to 150 proteins. At least 28 out of them are structural [3].

Due to the fact that no effective and safe vaccines against ASF have been developed the disease is controlled by its timely diagnosis and outbreak eradication.

ASF laboratory diagnosis is based on the detection of the disease agent or antibodies in blood and organs of infected animals. Direct virus detection techniques (isolation in cell culture, direct IFA, PCR) are of choice for the diagnosis of peracute and acute ASF forms. Serological methods are preferred for the diagnosis of subacute and chronic forms of the disease; detection of ASFV antibodies is the major tool to detect animals infected with low virulent strains [2].

The World Organization for Animal Health recommends enzyme-linked immunosorbent assay as a technique of the first choice for ASF serological diagnosis. In

the OIE-recommended ELISA (hereinafter OIE-ELISA) semipurified proteins of ASF virus grown in MS cell culture are used as an antigen [6]. The preparation of such an antigen is hard to be standardized and associated with biological risks. Besides, notwithstanding high sensitivity of the OIE-ELISA, its specificity is rather low [4].

In this context intensive research aimed at preparation and use of recombinant antigens in ASF serological diagnosis is carried out now. Recombinant antigens are biologically safe, easier to prepare and ensure higher ELISA specificity. So far the use of several recombinant proteins like p54 [7, 8], p30 [9, 11], pp62 [5], p10, p72, pA104R, pC44L, pCP312R [12] in ASF serological diagnosis have been reported. In 2009 C. Gallardo et al. demonstrated that pK205R and pB602L recombinant proteins are promising antigens for ASF serological diagnosis. ELISA using these recombinant antigens was highly sensitive and specific for ASFV antibody detection in porcine sera [10].

The target of the work done was the obtaining of pK205R and pB602L recombinant proteins by expression in *E. coli*; and optimization of their expression and purification conditions.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. ASFV Orenburg-2008 isolate was used for molecular cloning of K205R и B602L genes.

Viral DNA purification was carried out using 6M guanidinium thiocyanate and GF/F fibrous glass filters.

PCR. PCR mixture was made; it contained 5 µl of 10 × PCR buffer, 3 mM Mg²⁺, 0,2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA polymerase, 20 picomoles of each primer, 5 µl of DNA solution and water up to 50 µl final volume. The reaction was run using Mastercycler PCR machine (Eppendorf, Germany). The program included three minute initial denaturation at 94°C and 35 PCR cycles: 30 second denaturation at 94°C, 30 second primer annealing at 55°C and 40 second elongation at 72°C. PCR products were analyzed using electrophoresis in 2% agarose gel containing 0,001% ethidium bromide at 50 mA.

Molecular cloning of K205R and B602L genes was carried out in accordance with standard methods [1].

Expression of recombinant proteins. *E. coli* were cultivated in an orbital shaker at 150 rpm and 37°C. IPTG in-

ducer (Promega, USA) was added into cell culture in its log phase. Expression level and recombinant protein size were determined by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel.

RESULTS AND DISCUSSION

K205R and B602L genes were amplified by PCR using Russian ASFV isolate. Primers containing Bam HI and Hind III restriction sites were used in the reaction. The amplicons were treated with restriction endonucleases and then cloned in expression plasmid vector under T5 promoter. Recombinant plasmid physical maps are shown in Figures 1 and 2.

As a result of transformation of JM109 *E. coli* competent cells by recombinant plasmids clones expressing ASFV pK205R and pB602L recombinant proteins were obtained. Molecular mass of recombinant proteins was consistent with the estimated one (Fig. 3, Bands 1 and 3).

In order to increase the level of recombinant protein accumulation in *E. coli* cells the experiments aimed at the optimization of expression conditions were carried out. The optimization was done in relation to two parameters: inducer (IPTG) concentration and expression duration.

The influence of inducer concentration on expression level was studied within the range of 0,01 to 2 mM. Protein expression level was estimated visually using the electrophogram. The accumulation of pK205R and pB602L recombinant proteins was maximal at IPTG concentration of 0,5 mM, and was not changed by the further inducer concentration increase.

The results obtained enabled to establish that IPTG concentration of 0,5 mM was sufficient for the expression of pK205R and pB602L recombinant proteins; and all subsequent experiments were carried out using the said inducer concentration.

When the optimal inducer concentration was established the kinetics of protein expression was studied. For this purpose the aliquots of cell culture were taken 0,25; 0,5; 1; 2; 4 and 18 hours post induction and were studied in 12% polyacrylamide gel. It was found that proteins were relatively stable, because even after 18 hours of expression no proteolysis was observed. pK205R and pB602L accumulation was maximal 4 hours post induction and it remained the same afterwards, that's why the abovementioned time period was used for the subsequent experiments.

The next stage of the research was devoted to the optimization of pK205R and pB602L purification and concen-

tration. There were six histidine residues at N-terminus of the proteins. This enabled to purify pK205R and pB602L by metal-chelate affinity chromatography. Due to the fact that recombinant proteins accumulated in *E. coli* cells were insoluble they were purified under denaturing conditions.

When using 8M urea as a denaturant just an insignificant part of recombinant proteins was dissolved; the rest of them precipitated with cell debris during centrifugation. pK205R and pB602L were dissolved much better when using 6M guanidinium chloride than urea. Hence 6M guanidinium chloride was included into the buffer for cell lysis and washing.

Dissolved recombinant proteins were purified by metal-chelate affinity chromatography using Ni-NTA-agarose («Qiagen»). The conditions recommended by the adsorbent manufacturer for recombinant protein elution turned out to be inapplicable because proteins could not be eluted from the adsorbent under conventional conditions, i.e. low pH levels and 0,2M imidazole. Only when imidazole concentration in the elution buffer was increased up to 0,4M the most part of the proteins eluted. The further increase in imidazole concentration in the elution buffer did not influence the yield of proteins in the eluate. Thus the use of 0,4M imidazole solution was optimal for protein elution.

When all parameters were optimized, the following procedure of pK205R and pB602L recombinant protein expression and purification was adopted. 1 ml of *E. coli* recombinant clone cell culture was added into a flask with 100 ml of LB medium containing 100 mg/ml of ampicillin and was incubated at 170 rpm, +37°C. IPTG was added into cell culture at OD₆₀₀=0,5 density up to 0,5 mM final concentration and was incubated for 4 hours more under the same conditions. *E. coli* cell culture was transferred into centrifuge beakers and centrifuged for 15 minutes at 5000 rpm. Supernatant was removed; the precipitate was resuspended in 5 ml of lysis/washing buffer (6M guanidinium chloride, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 8,0) and mixed for 30 minutes. The lysate was centrifuged for 5 minutes at 12000 g. The precipitate was removed and 1 ml of adsorbent (Ni-NTA agarose) was added to the supernatant and then was mixed for 15 minutes; after that

the suspension was centrifuged for 1 minute at 12000 g. The supernatant was removed; then it was washed twice in 10 ml of lysis/washing buffer. For the purpose of recombinant protein elution 1 ml of elution solution (0,4M imidazole, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01 mM Tris-HCl, pH 8,0) was added into the precipitate, mixed for 1 minute and then centrifuged for 1 minute at 12000 g. The supernatant contained purified recombinant proteins. To evaluate the level of recombinant protein purification and concentration electrophoresis in 12% polyacrylamide gel by Laemmli's method was performed.

Using the described technique purified recombinant proteins at high concentration were prepared. The purified protein yield from 100 ml of *E. coli* culture was 1,5 mg for pK205R and 2 mg for pB602L (Fig. 3, Bands 2 and 4).

Based on the obtained recombinant antigens it is planned to develop indirect ELISA for the detection of ASFV antibodies in porcine sera.

CONCLUSIONS

Molecular cloning of ASFV K205R and B602L genes was carried out. *E. coli* clones expressing pK205R and pB602L recombinant proteins were obtained. The expression and purification conditions were optimized which enabled to get high yield of purified recombinant proteins.

REFERENCES

1. MANIATIS T., Fritsch E., Sambrook D. Genetic engineering techniques. Molecular cloning. – M: Mir, 1984. – 480 p.
2. African swine fever // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2012. – Vol. 2, Chap. 2.8.1. – URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (date of visit: 01.10.14).
3. African swine fever / J.M. Sanchez-Vizcaino, B. Straw, S. D'Allaire, W. Mengeling // Diseases of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 291–298.
4. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gomez, N. Moreno [et al.] // Virus Res. – 2013. – Vol. 173. – P. 159–167.
5. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodriguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 950–956.
6. Escribano J.M., Pastor M.J., Sanchez Vizcaino J.M. Antibodies to bovine serum albumin in swine

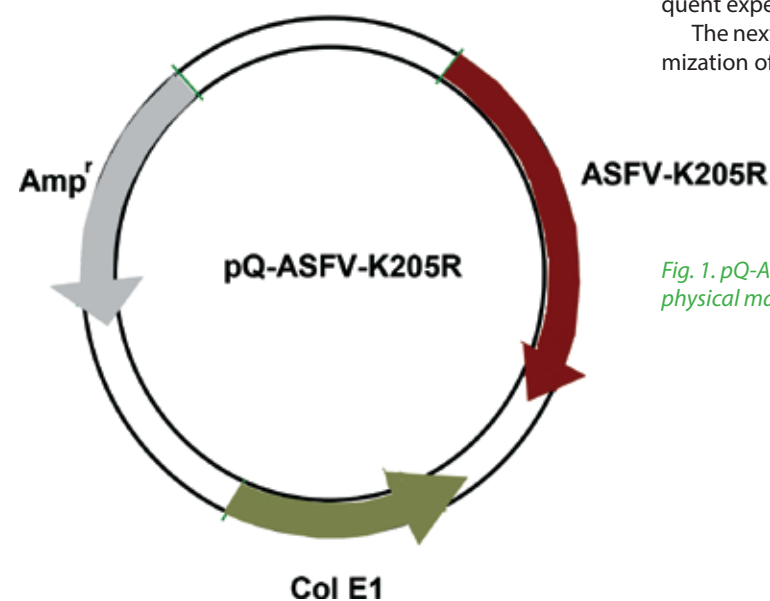


Fig. 1. pQ-ASFV-K205R recombinant plasmid physical map

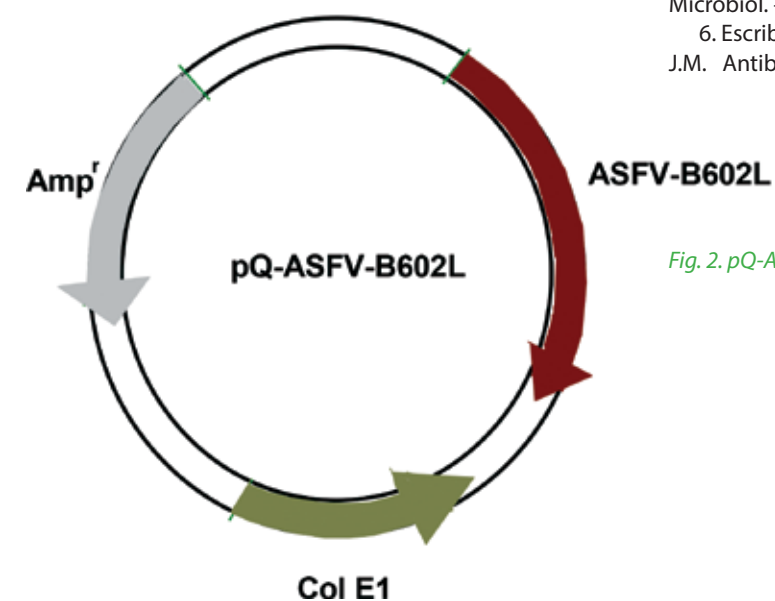


Fig. 2. pQ-ASFV-B602L recombinant plasmid physical map

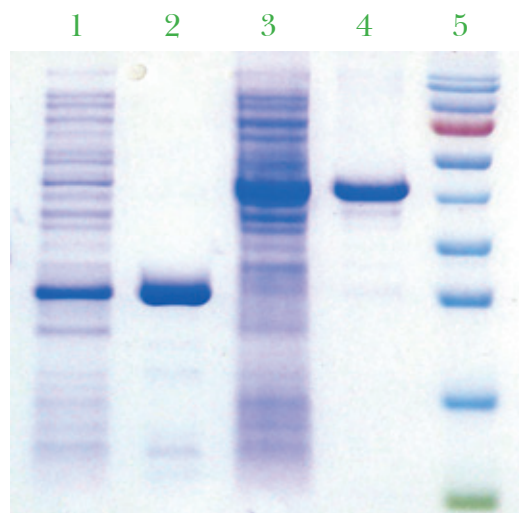


Fig. 3. ASFV pK205R and pB602L recombinant protein expression in *E. coli*, testing in 12% polyacrylamide gel

1 – pK205R recombinant protein expression in *E. coli*;
 2 – pK205R recombinant protein purified product;
 3 – pB602L recombinant protein expression in *E. coli*;
 4 – pB602L recombinant protein purified product;
 5 – protein molecular mass marker (170, 130, 95, 72, 55, 43, 26, 17, 10 kDa).

sera: implications for false positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever // *Am. J. Vet. Res.* — 1989. — Vol. 50. — P. 1118–1122.

7. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodriguez, P. Gomez-Puertas [et al.] // *J. Virol. Meth.* — 1997. — Vol. 64. — P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C. Alcaraz, F. Rodriguez, J. Oviedo [et al.] // *J. Virol. Meth.* — 1995. — Vol. 52. — P. 111–119.

9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced on *Trichoplusia ni*

larvae / D.M. Perez-Filgueira, F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44. — P. 3114–3121.

10. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2009. — Vol. 16. — P. 1012–1020.

11. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // *J. Virol. Meth.* — 2000. — Vol. 89. — P. 129–136.

12. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // *J. Gen. Virol.* — 2007. — Vol. 88. — P. 2426–2434.



УДК 619:616.98:578.826.1:616-085.371

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ИЗГОТОВЛЕННОЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ 2 СЕРОТИПА

А.А. Перепеча¹, С.В. Фролов², Д.Л. Долгов³, М.А. Волкова⁴, Д.А. Глейзер⁵

¹ ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: perepecha@arriah.ru

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

³ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по изучению иммуногенной активности инактивированной вакцины, изготовленной на основе изолята аденовируса птиц FAdV-2. Показана динамика накопления антител в крови цыплят. Также продемонстрирована высокая устойчивость иммунизированных цыплят к заражению гомологичным вирусом (FAdV-2) и отсутствие такой защиты к заражению гетерологичным вирусом (FAdV-4).

Ключевые слова: аденовирус птиц, инактивированная вакцина, антиген, специфические антитела, иммуногенность.

UDC 619:616.98:578.826.1:616-085.371

STUDY OF IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF AVIAN ADENOVIRUS SEROTYPE 2 – BASED VACCINE AGAINST ADENOVIRUS INFECTION

A.A. Perepecha¹, S.V. Frolov², D.L. Dolgov³, M.A. Volkova⁴, D.A. Gleyzer⁵

¹ leading technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: perepecha@arriah.ru

² head of laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁴ leading researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁵ senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The data on studying immunogenic activity of the inactivated vaccine produced on the basis of avian adenovirus isolate FAdV-2 are demonstrated in the paper. The dynamics of antibody accumulation in chicken blood is shown. The high resistance of immunized chicks to homologous virus (FAdV-2) infection and lack of protection against heterologous virus (FAdV-4) infection are also demonstrated.

Key words: avian adenovirus, inactivated vaccine, antigen, specific antibodies, immunogenicity.



Рис. Выявление антител к аденовирусу птиц FAdV-2 в сыворотках крови цыплят, иммунизированных экспериментальной инактивированной вакциной

ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусы птиц (FAdV) относятся к роду *Aviadenovirus* семейства *Adenoviridae* — это многочисленная, но сравнительно малоизученная группа вирусов. Вирусы данной группы вызывают различные клинические и патологоанатомические признаки при инфицировании птиц, в частности поражения респираторной системы, энтериты, геморрагические воспаления в мышцах и висцеральных органах, могут сопровождаться снижением яичной продуктивности и признаками поражения нервной системы. При этом длительное вирусоносительство обеспечивает продолжительное выделение вируса во внешнюю среду переболевшей птицей, что способствует дальнейшему распространению инфекции [1, 2, 7, 8].

В качестве одной из мер борьбы с инфекцией всегда рассматривается вакцинопрофилактика. Все более часто среди цыплят-бройлеров встречается такое проявление аденовирусной инфекции, как гепатит с тельцами-включениями [4–8]. При этом в последнее время в качестве этиологического агента, связанного с развитием данного синдрома, часто выявляют аденовирус птиц 2 серотипа (FAdV-2) [2, 4–6]. Мониторинг некоторых птицеводств Российской Федерации сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» позволил выявить в них циркуляцию аденовируса 2 серотипа. Смертность среди бройлеров в возрасте 1–7 недель, наиболее восприимчивых к этому возбудителю, может достигать 15% [1, 2]. Отсюда, естественно, возникает интерес к изучению биологических свойств таких изолятов, в том числе и к изучению их иммуногенных свойств в составе профилактического препарата [2, 3].

Таблица

Протективная активность экспериментальной вакцины при заражении цыплят гомологичным (FAdV-2) и гетерологичным (FAdV-4) типами аденовируса птиц $n=3$

Аденовирус, используемый для заражения	Иммунный статус цыплят	
	вакцинированные	невакцинированные
изолят FAdV-2	0/5*	5/5
штамм «КР-95» FAdV-4	5/5	5/5

* в числителе — число павших или клинически больных птиц, в знаменателе — общее число зараженных птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали изолят аденовируса птиц FAdV-2 третьего пассажа на СПФ-цыплятах с инфекционной активностью $5,83 \text{ Ig ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ и аденовирус птиц FAdV-4 производственный штамм «КР-95» с инфекционной активностью $6,5 \text{ Ig ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$.

Вакцины. В исследованиях использовали инактивированную сорбированную вакцину, изготовленную на основе изолята аденовируса птиц FAdV-2.

Птица. В опыте использовали 20 коммерческих цыплят яичного направления 20-суточного возраста, не имеющих антител к аденовирусам птиц, которых содержали в изоляторах ИЗОП-6 на рациионе согласно зоотехническим нормам.

Схема эксперимента. Опытных цыплят разделили на две группы по 10 голов в каждой. Птиц первой группы иммунизировали вакциной на основе изолята FAdV-2, второй — не вакцинировали и использовали в качестве отрицательного контроля.

Вакцину в объеме $0,5 \text{ см}^3$ вводили однократно в грудную мышцу. Через 22 суток из вакцинированных и невакцинированных цыплят были сформированы две новые группы, состоящие из 5 вакцинированных и 5 невакцинированных голов. Далее цыплят первой группы заражали аденовирусом птиц FAdV-4 штамм «КР-95» в дозе $7,2 \text{ Ig ЛД}_{50}/\text{см}^3$, а второй группы аденовирусом птиц FAdV-2 в дозе $6,5 \text{ Ig ЛД}_{50}/\text{см}^3$. Клиническое наблюдение за цыплятами вели в течение 14 суток. Кроме того, у всех групп цыплят отбирали кровь через 7, 14, 21 сутки после вакцинации.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Определение титра антител к FAdV-2 проводили в непрямом варианте ИФА с использованием планшетов, сенсibilизированных антигеном аденовируса птиц FAdV-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены результаты исследования сывороток крови цыплят на наличие антител к аденовирусу птиц FAdV-2 после иммунизации экспериментальной вакциной.

Из данных, представленных на рисунке, видно, что вакцинация цыплят вызвала образование гуморальных специфических антител к вирусу FAdV-2 с титрами в ИФА до 4516. Особенно интенсивный прирост антител наблюдался с 7 по 14 сутки после вакцинации.

В таблице представлены результаты устойчивости цыплят к заражению аденовирусами птиц гомологичного (FAdV-2) и гетерологичного (FAdV-4) типов.

Из данных таблицы следует, что цыплята, иммунизированные экспериментальной инактивированной сорбированной вакциной против FAdV-2, были полностью защищены от гибели при заражении гомологичным (FAdV-2) типом аденовируса птиц и не были защищены от заражения гетерологичным (FAdV-4) типом вируса.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная инактивированная вакцина на основе изолята FAdV-2 обладает высокой иммуногенной активностью.

2. Вакцина обладает высокой протективной активностью в отношении антигенно родственного аденовируса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова М.А., Ирза А.В., Бахчин И.В. Иммунный ответ цыплят на экспериментальное заражение изолятом аденовируса птиц FAdV2/1/2012 // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2014. — Т. 12. — С. 121–132.

2. Волкова М.А., Ирза А.В., Лазарева С.П. Идентификация аденовируса птиц, выделенного в Российской Федерации от кур с признаками гепатита, с использованием ПЦР-РВ и ИФА // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2013. — Т. 11. — С. 34–42.

3. Deshmukh V.V., Aziz A., Gujar M.B. Humoral immune response in broilers against inclusion body hepatitis virus // Indian J. Animal Sciences. — 2000. — Vol. 70, № 4. — P. 340–342.

4. El-Attrache J., Villegas P. Genomic identification and characterization of avian adenoviruses associated with inclusion body hepatitis // Avian Dis. — 2001. — Vol. 45, № 4. — P. 780–787.

5. Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses / D. Ojkic, E. Martin, J. Swinton [et al.] // Avian Pathol. — 2008. — Vol. 37, № 1. — P. 95–100.

6. Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: A review / M. Hess // Avian Pathol. — 2000. — Vol. 29, № 3. — P. 195–206.

7. Inclusion body hepatitis outbreak associated with fowl adenovirus type 8b in broilers / M. Zadavec [et al.] // Acta Veterinaria. — 2013. — Vol. 63, № 1. — P. 101–110.

8. Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis / J.B. McFerran [et al.] // Avian Pathol. — 1976. — Vol. 5. — P. 315–324.

УДК 619:616-074:636.52/58

ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ КУР И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА BD FACSVeRSE™

М.А. Волкова¹, Ир.А. Чвала²

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

² старший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Разработана методика идентификации Т- и В-лимфоцитов кур и их субпопуляций методом проточной цитометрии с использованием прибора BD FACSVeRse™. Определён способ выделения лимфоцитарного гейта под контролем экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 и моноцитарного антигена. Подобраны и испытаны панели антител для иммунофенотипирования лимфоцитов при исследовании клеточного иммунного ответа кур, позволяющие определить относительное количество Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-цитотоксических популяций клеток в крови и лимфоидных органах кур. Показана специфичность и воспроизводимость разработанной методики идентификации субпопуляций лимфоцитов кур.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия, иммунофенотипирование лимфоцитов кур.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проточная цитометрия находит всё большее применение в ветеринарной иммунологии. Использование различных наборов клеточных маркеров позволяет проводить исследования типов клеток и их функционального состояния, определять количественное соотношение различных субпопуляций клеток.

Имунофенотипирование лимфоцитов заключается в обнаружении на их поверхности маркеров дифференциации или CD-антигенов. Классификация CD (*cluster of differentiation antigens*) основана на различиях между кластерами клеток в поверхностных дифференцировочных маркерах.

Основными маркерами CD для оценки состояния клеточного звена иммунитета кур являются CD45, характеризующий общий пул лейкоцитов, и CD3 — маркер зрелых Т-лимфоцитов [3, 6]. Зрелые Т-клетки (тимocyты и Т-лимфоциты) экспрессируют CD3 на клеточной мембране во взаимосвязи с Т-клеточным рецептором (TCR), включая различные цепи Т-клеточного рецептора TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$ (TCR1) [8]. Вместе они образуют так называемый TCR-CD3-комплекс. Другие Т-клеточные маркеры (CD4, CD8 α , CD8 β) позволяют охарактеризовать иммунофенотип Т-клеток на дальнейших этапах дифференцировки. CD4 экспрессируют тимocyты, Т-лимфоциты (Т-хелперы) и моноциты/макрофаги [4]. CD8 α и CD8 β распознают тимocyты, цитотоксические Т-лимфоциты двух различных субпопуляций Т-клеток (гомо α/α - и гетеро α/β -димеры). Гомодимеры выявляют преимущественно у молодых птиц [5, 7].

Vu1a и Vu1b экспрессируются на поверхности клеточной мембраны В-лимфоцитов главным образом инбредных цыплят соответствующих линий (Vu1a и Vu1b). Антиген Vu1 распознаёт В-лимфоциты цыплят обеих линий. Vu1, Vu1a, Vu1b также экспрессируются на поверхности макрофагов и моноцитов, но не эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов. Антиген MHC-II (главный комплекс гистосовместимости II класса) распознаёт В-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки [5, 6].

Метод проточной цитометрии основан на регистрации свторассеяния и флуоресценции отдельных клеток в суспензии, пересекающих одна за другой вместе с потоком жидкости луч монохроматического света (обычно света лазера). Фотометрические каналы используются для оценки размеров клетки и внутриклеточных структур. Флуоресцентный канал применяется для изучения клеточных маркеров, для чего используются моноклональные антитела, меченные различными флуорохромными красителями к мембранным и внутриклеточным компонентам клеток (белкам, ДНК и РНК) [1]. Разработка нового, более совершенного проточно-цитометрического оборудования, использующего многоцветный анализ и компьютеризированные

методы обработки данных, расширила возможности этого метода.

Целью работы была разработка методики идентификации Т- и В-клеток кур и их субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии с использованием BD FACSVeTM.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение лимфоцитов из лимфоидных органов и крови кур. Для выделения лимфоцитов из ткани лимфоидных органов кур (селезёнка, бурса) отобранные в соответствии с правилами асептики органы помещали в фосфатный буферный раствор (0,1М фосфатный буфер с 0,85% NaCl, pH 7,2). Далее готовили суспензию из отдельных клеток, пропуская органы через стерильное нейлоновое сито в соответствующее количество среды RPMI 1640 (1:10 от массы пробы). Клеточную суспензию наслаивали на градиент Ficoll-PaqueTM (Amersham Biosciences, Швеция) (плотность 1,007) в соотношении 2:3 и центрифугировали при 453 г в течение 30 мин. Выделенную фракцию лимфоцитов отмывали 1 раз фосфатно-буферным раствором (ФБР) путём центрифугирования при 300 г в течение 10 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1650. Выделение лимфоцитов из периферической крови кур проводили по стандартной методике [1] с использованием Ficoll-PaqueTM PLUS. Подсчет и определение жизнеспособности клеток проводили в счётчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Корея). Концентрацию лимфоцитов доводили раствором ФБР до 10⁶-10⁷ клеток/мл.

Подготовка проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов. К 50 мкл подготовленных проб в нескольких повторностях (в зависимости от количества используемых панелей антител) добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромом (флуоресцеинизотиоцианат — FITC, фикоэритрин — PE) в количестве, рекомендованном фирмой-производителем (Southern Biotech, США; Serotec, Англия). Пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 4-8 °С. Отмывали от несвязавшихся антител центрифугированием в ФБР в течение 10 мин при

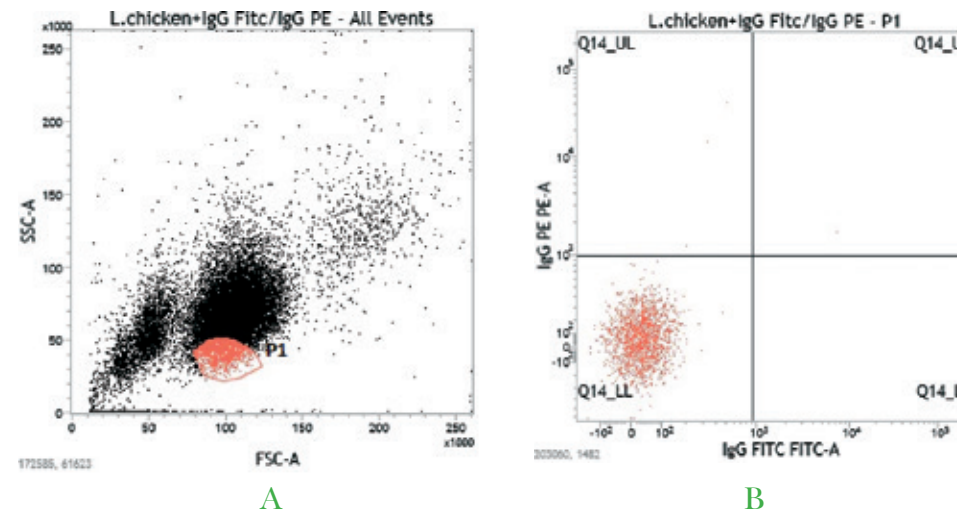


Рис. 2. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови А — выделение лимфоцитарного гейта P1 по каналам прямого и бокового светорассеяния; В — определение границ квадрантов для детекторов флуоресценции (FITC и PE) в соответствии с размерами гейта изотипического контроля.

260 г. Осадок ресуспендировали в 1,0 мл проточной жидкости для измерения на цитометре.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Анализ иммунофенотипических особенностей клеток проводили на проточном цитометре BD FACSVeTM (BD Bioscience, США). После настройки прибора с использованием калибровочных частиц BD FACSuiteTM FC Beads-4c Research kit и BD FACSuiteTM. Research Beads (США) проводили измерение испытуемых проб согласно инструкции к прибору и анализ измеренных популяций клеток с использованием пакета программ: BD FACSuite Software: Worklist Workflow или Expirement Workflow.

Экспериментальные животные. Для отбора проб крови и лимфоидных органов использовали коммерческих цыплят-бройлеров в возрасте от 8 до 21 суток (15 голов) и кур яичного направления в возрасте от 53 до 120 суток (25 голов).

Статистический анализ результатов. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики идентификации Т- и В-клеток кур и их субпопуляций методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACSVeTM включала несколько этапов.

На первом этапе необходимо было определить способ выделения лимфоцитарного гейта изучаемой клеточной популяции. Согласно данным литературы, существует несколько способов выделения лимфоцитарного гейта [1, 2]. Экспериментальным путём был выбран способ выделения лимфоцитарного гейта под контролем экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 и моноцитарного антигена (рис. 1).

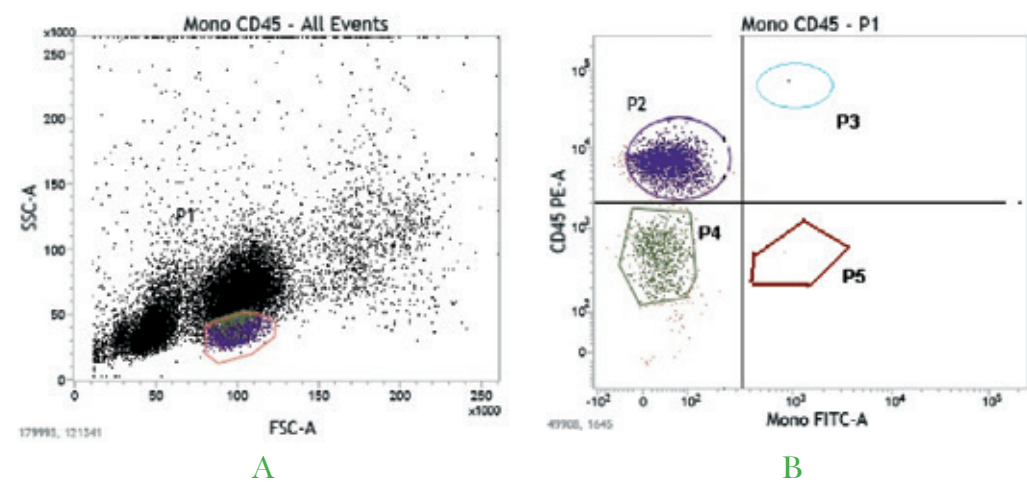


Рис. 1. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови А — выделение лимфоцитарного гейта (P1) по каналам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; В — точечный график распределения клеток на две популяции (моноциты и лейкоциты): P2 (Моно-/CD45+) — лейкоциты; P3 (Моно+/CD45+) — моноциты; P4 (Моно-/CD45-) и P5 (Моно+/CD45-) — дробис.

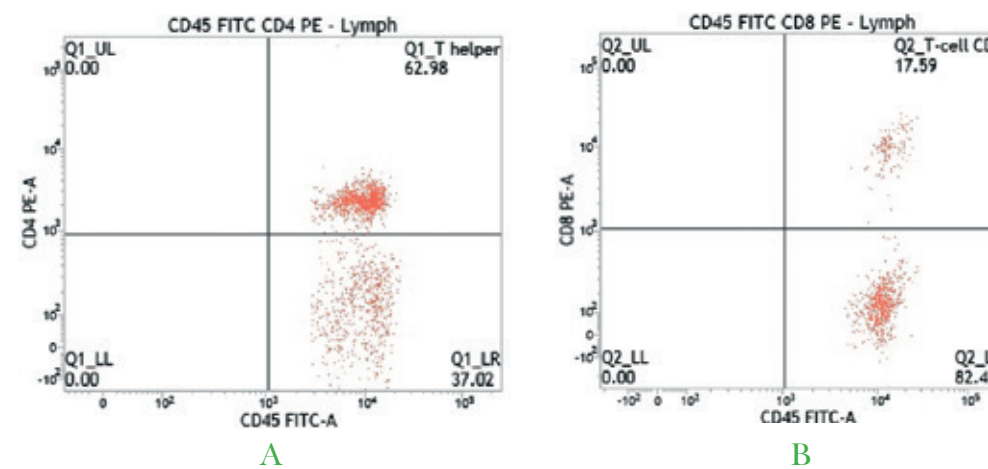


Рис. 3. Определение основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови цыплят с помощью комбинаций моноклональных антител CD45FITC/CD4PE и CD45FITC/CD8PE А — точечный график, на котором в правом верхнем квадранте расположены CD45+CD4+ лимфоциты (Т-хелперы); В — точечный график, на котором в правом верхнем квадранте расположены CD45+CD8+ лимфоциты (Т-цитотоксические лимфоциты).

Максимальное количество событий при этом располагалось в левом верхнем квадранте (гейт P2) графика CD45 PE/CD monocyte/macrophage FITC.

Следующий этап заключался в выборе изотипического контроля для установления маркеров интенсивности флуоресценции и неспецифического окрашивания. В качестве оптимального изотипического контроля был выбран IgG FITC/IgG PE, содержащий антимишьяные иммуноглобулины G (IgG), меченные FITC и PE (рис. 2).

По данным литературы были составлены и испытаны панели антител для иммунофенотипирования лимфоцитов при исследовании клеточного иммунного ответа кур:

- CD45FITC/CD3PE — Т-лимфоциты;
- CD45FITC/CD4PE — Т-хелперы;
- CD45FITC/CD8PE — цитотоксические Т-лимфоциты;
- TCRαβFITC /TCRγδPE — Т-лимфоциты;
- CD45FITC/МНС-IIPE — В-лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки;
- CD45FITC/Bu1PE — В-лимфоциты.

На рис. 3 представлены результаты определения основных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) в периферической крови цыплят с использованием выбранных панелей антител.

Для определения специфичности метода проводили иммунофенотипическое исследование выделенных из периферической крови лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к поверхностным маркерам человека, крупного рогатого скота, свиньи и кур (рис. 4).

Наличие позитивных событий на точечном графике PE/FITC было выявлено только при исследовании проб

лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к CD45 и CD3 кур (рис. 4D).

Для определения внутрилабораторной воспроизводимости было проведено иммунофенотипическое исследование выделенных из периферической крови лимфоцитов кур, конъюгированных с моноклональными антителами к CD45, CD3, CD4 и CD8β кур в 4-х повторностях. Данные анализа представлены на рис. 5.

Коэффициент вариации между полученными результатами в каждой измеряемой популяции клеток не превышал 3%, разница максимальной и минимальной величин в 95% доверительном интервале была не больше 2%, что свидетельствует о воспроизводимости метода [1, 2].

Был проведён ряд исследований субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови и лимфоидных органов кур с использованием разработанной методики. Полученные результаты представлены в табл. 1–2.

Согласно полученным данным процентное содержание основных популяций иммунокомпетентных клеток у цыплят-бройлеров составляло: Т-хелперы — 42–66% в крови и 25–35% в селезёнке, Т-цитотоксические клетки — 14–25% в крови и 20–31% в селезёнке. В-лимфоцитов в бурсе цыплят-бройлеров было 78–99% (табл. 1).

У цыплят яичного направления содержание Т-хелперов в крови было 35–58%, в селезёнке 19–35%. Процент Т-цитотоксических клеток составил 4,5–14% в крови и 25,5–40,5% в селезёнке. Содержание В-лимфоцитов в селезёнке — 5–20% и в крови 1–7% (табл. 2).

Полученные результаты соответствовали данным по процентному содержанию рассматриваемых попу-

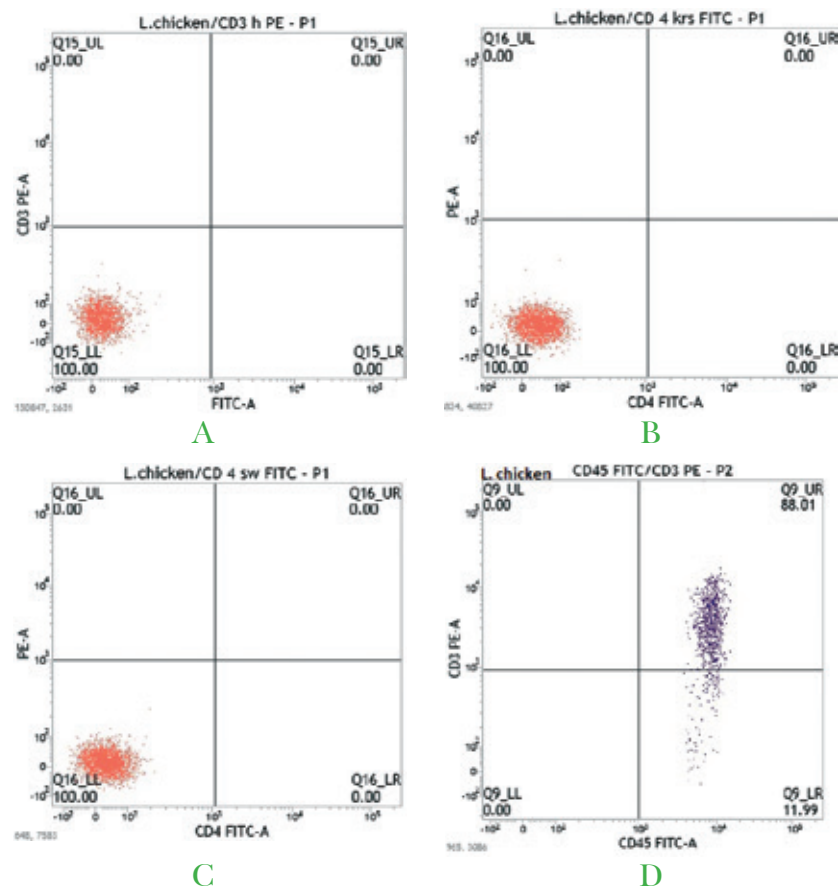


Рис. 4. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови кур

А — точечный график лимфоциты кур/CD3PE человека, в нижнем левом квадранте 100% событий CD3PE-/FITC-;

В — точечный график лимфоциты кур/CD4FITC крупного рогатого скота, в нижнем левом квадранте 100% событий PE-/CD4FITC-;

С — точечный график лимфоциты кур/CD4FITC свиньи, в нижнем левом квадранте 100% событий PE-/CD4FITC-;

Д — точечный график лимфоциты кур/CD45FITC/CD3PE кур, в верхнем правом квадранте 88,01% CD45+/FITC/CD3+PE клеток (Т-лимфоциты).

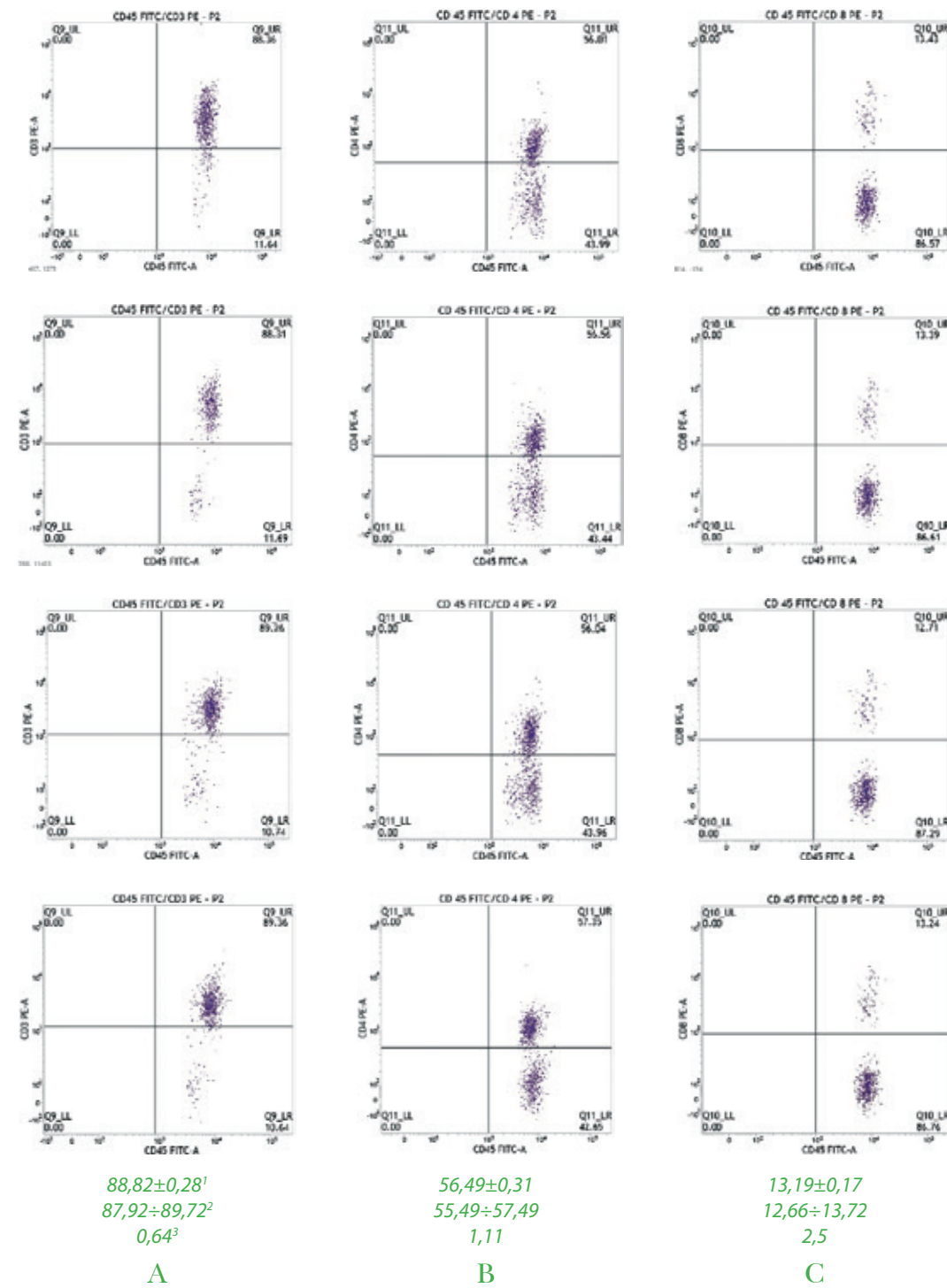


Рис. 5. Иммунофенотипическое исследование клеток периферической крови кур

А — точечный график CD45FITC/CD3PE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD3+ лимфоциты (Т-лимфоциты);

В — точечный график CD45FITC/CD4PE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD4+ лимфоциты (Т-хелперы);

С — точечный график CD45FITC/CD8βPE, в верхнем правом квадранте расположены CD45+CD8+ лимфоциты (Т-цитотоксические клетки)

¹ среднее значение плюс-минус стандартная ошибка среднего;

² 95% доверительный интервал;

³ коэффициент вариации.

ляций иммунокомпетентных клеток в периферической крови и лимфоидных органах кур, которые представлены фирмами-производителями моноклональных антител для проточной цитофлуориметрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, был разработан специфичный и воспроизводимый метод иммунофенотипирования клеток крови и лимфоидных органов кур методом проточной

Таблица 1
Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови, бursы и селезёнки цыплят-бройлеров
n=3

Возраст птиц, сут.	В-лимфоциты, %		Т-лимфоциты, %		
	бурса	кровь		селезёнка	
		CD45+Bu1a+	CD45+CD4+	CD45+CD8a+	CD45+CD4+
8	80,91±2,88	45,41±3,38	16,14±1,57	25,93±4,38	22,49±0,3
10	96,43±1,4	49,5±1,12	13,68±0,39	29,32±1,2	24,93±4,74
13	97,26±0,02	59,39±6,53	18,15±1,73	30,32±5,47	21,25±0,18
16	94,11±2,06	50,06±4,36	20,1±4,17	30,14±2,81	23,55±3,78
21	97,08±0,98	46,29±2,91	20,06±4,67	29,81±5,08	26,07±5,22

Таблица 2
Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови и селезёнки цыплят яичного направления
n=5

Возраст птиц, сут.	В-лимфоциты, %		Т-лимфоциты, %			
	кровь	селезёнка	кровь		селезёнка	
			CD45+MHCII+	CD45+CD4+	CD45+CD8β+	CD45+CD4+
53	5,38±1,73	10,17±5,16	45,54±10,2	5,78±1,18	28,55±5,49	34,79±3,0
57	1,21±0,13	13,95±3,29	47,43±0,49	8,76±3,77	31,5±3,93	33,75±6,82
62	1,11±0,18	14,36±5,84	54,66±3,12	8,1±2,33	27,31±5,35	32,5±5,77
70	2,29±1,0	12,37±0,86	55,06±3,28	12,91±1,36	27,33±8,02	25,19±0,59
120	2,45±0,43	н/д	53,41±2,6	13,36±1,05	н/д	н/д

н/д — нет данных.

цитофлуориметрии с использованием прибора BD FACSVerse™. Проведенные исследования показали возможность использования разработанного метода для определения и количественной оценки различных популяций и субпопуляций лимфоцитов кур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. А.И. Карпищенко. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — Т. 2. — С. 274–314.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнёв В.А. Многоцветный цитометрический анализ. Идентификация Т-клеток и их субпопуляций по экспрессии αβ-TcR и γδ-TcR // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2–3. — С. 115–124.
3. Evaluation of CD45+ cells kinetics in the blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine / M. Popovic, M. Balenovic, A.E. Kabalin [et al.] // Veterinarski Arhiv. — 2010. — Vol. 80, № 1. — P. 61–69.

4. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution / T.S. Dalgaard, L.R. Norup, D. Rubbenstroth [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2010. — Vol. 138, № 1–2. — P. 85–94.

5. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges / B.C.B. Beirao, C. Favoro Jr., L.S. Nakao [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2012. — Vol. 145, № 1–2. — P. 32–41.

6. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability / Y. M. Fair, K.J. Taylor-McCabe, Y. Shou, B.L. Marrone // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2008. — Vol. 125, № 3–4. — P. 268–273.

7. Karczynski D.R. Detection of cell-mediated immune response to avian influenza viruses / Animal Influenza Virus: Methods Mol. Biol. — 2014. — Vol. 1161. — P. 199–215.

8. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens / B.W. Bridle, R. Julian, P.E. Shewen [et al.] // Can. J. Vet. Res. — 2006. — Vol. 70. — P. 183–190.

UDC 619:616-074:636.52/.58

IDENTIFICATION OF T- AND B-LYMPHOCYTES IN CHICKENS AND THEIR SUBPOPULATIONS BY FLOW CYTOFLUOROMETRIC ANALYSIS USING FLOW CYTOMETER BD FACSVeRSE™

M.A. Volkova¹, Ir.A. Chvala²

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

² Leading Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

Method of identification of T- and B-lymphocytes in chickens and their subpopulations by flow cytometric analysis using BD FACSVerse™ was developed. Method of lymphocytic gate extraction with control of leukocyte common antigen CD45 and monocytic antigen expression was determined. Antibody panels for immunophenotyping lymphocytes when testing chicken cell mediated immune response were selected and tested. They enable to determine a relative number of T- and B-lymphocytes, T-helpers and T-cytotoxic cell populations in blood and chicken lymphoid organs. The paper demonstrates specificity and reproducibility of the developed method of identification of chicken lymphocyte subpopulation.

Key words: flow cytometric analysis, immunophenotyping of chicken lymphocytes.

INTRODUCTION

In the present time flow cytometry is increasingly applied in veterinary immunology. Usage of different sets of cell markers enables testing of different types of cells and their functional status and determination of proportion of different cell subpopulations.

Lymphocyte immunophenotyping is detection of differentiation markers or CD-antigens on their surface. CD classification (cluster of differentiation agents) is based upon differences between cell clusters in surface and differentiation markers.

Basic CD markers for assessment of cell component of chicken immunity are CD45 characterizing common pool of leucocytes and CD3-marker - mature T-lymphocytes [3, 6]. Mature T-cells (thymocytes and T-lymphocytes) express T-cell receptor (TCR) together with CD3 on cell membrane including different chains of T-cell receptor TCR TCRαβ and TCRγδ (TCR1) [8]. Together they form a so called TCR-CD3-complex. Other T-cell markers (CD4, CD8α, CD8β) make it possible to characterize immunophenotype of T-cells during further differentiation stages. CD4 express thymocytes, T-lymphocytes (T-helpers) and monocytes/macrophages [4]. CD8α and CD8β recognize thymocytes, cytotoxic T-lymphocytes of two different subpopulations

of T-cells (homo α/α- and hetero α/β-dimers). Homodimers are detected mostly in young birds [5, 7].

Bu1a and Bu1b are expressed on the surface of cell membrane of B-lymphocytes mostly of corresponding inbred chicken lines (Bu1a и Bu1b). Bu1 antigen recognizes B-lymphocytes of both chicken lines. Bu1, Bu1a, Bu1b are also expressed on the surface of macrophages and monocytes but not erythrocytes, granulocyte and thrombocyte. MHC-II antigen (major histocompatibility complex, II class) recognizes B-lymphocytes and antigen presenting cells [5, 6].

Flow cytometry is based on registration of light scattering and fluorescence of cells in suspension, one after another passing through homogeneous beam of light with the stream (usually laser light). Photometric channels are used for assessment of cell size and cell structure. Fluorescent channel is used for studying cell markers. For this purpose fluorochrome labeled monoclonal antibodies to membrane and intracellular components (proteins, DNA and RNA) are used [1]. Development of a new modern multicolor flow cytometry technique and computer based methods of data processing expanded opportunities of this method. The investigation was aimed at devel-

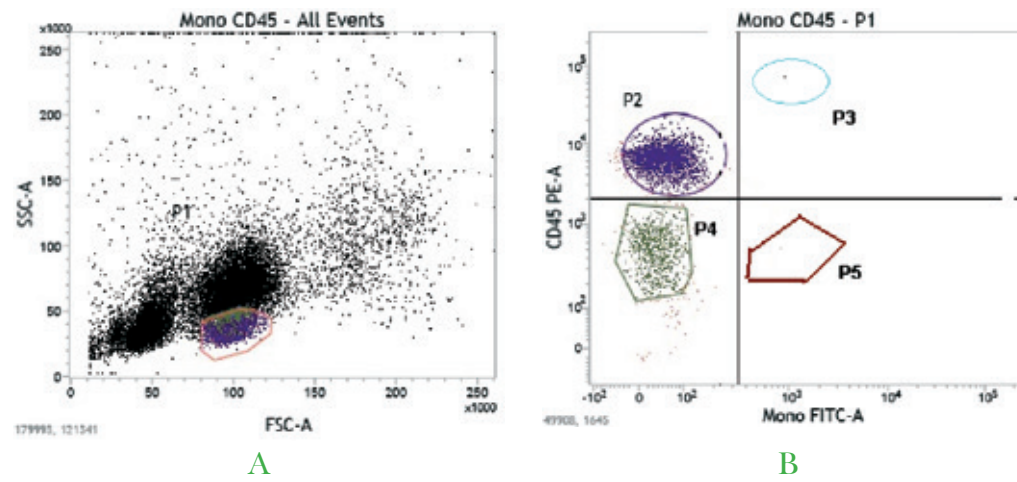


Fig. 1. Immunophenotypic tests of peripheral blood cells
A – lymphocyte gate extraction (P1) in forward scattering and (FSC) side scattering (SSC) channels;
B – dot diagram of cell distribution into two populations (monocytes and leucocytes): P2 (Mono-/CD45+) – leucocytes, P3 (Mono+/CD45+) – monocytes; P4 (Mono-/CD45-) and P5 (Mono+/CD45-) – debris.

oping a method of identification of T- and B-lymphocytes in chickens and their subpopulations by flow cytometric analysis using BD FACSVerser™.

MATERIALS AND METHODS

Lymphocyte extraction from chicken lymphoid organs and blood. For extraction of lymphocytes from chicken lymphoid organs (spleen, bursa) organs collected in conformance with aseptic rules were immersed in buffer solution (0,1M phosphate buffer with 0,85% NaCl, pH 7,2). Then a suspension was prepared using cells by putting organs through a sterile sieve into a necessary RPMI 1640 medium volume (1:10 of sample weight). Cell suspension was layered onto Ficoll-Paque™ gradient (Amersham Biosciences, Sweden) (1,007 density) in 2:3 proportion and centrifuged at 453 g for 30 min. Extracted lymphocyte fraction was washed with buffer solution 1 time by centrifuging at 300 g for 10 min. Cell pellet was resuspended in 1 ml of RPMI-1650 medium. Lymphocyte extraction from chicken peripheral blood was carried out according to the standard procedure [1] using Ficoll-Paque™ PLUS. Cell count and determination

of their viability was carried out using Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Korea). Lymphocyte concentration was adjusted to 10^6 – 10^7 cell/ml using buffer solution.

Sample preparation for detection of lymphocyte surface markers. Monoclonal antibodies conjugated to fluorochrome (Fluorescein isothiocyanate – FITC, phycoerythrin – PE) in a recommended by the manufacturer volume (Southern Biotech, США; Serotec, Англия) were added to 50 mcl of prepared samples in several replicates (depending on a number of used antibody panels). The samples were incubated for 30 min at 4–8°C. They were washed from unbound antibodies by centrifuging for 10 min at 260 g in buffer solution. The pellet was resuspended in 1,0 ml of stream for measuring using the cytometer.

Quantitative analysis of lymphocyte subpopulations. Analysis of immunophenotypic characteristics of cells was carried out using flow cytometer BD FACSVerser™ (BD Bioscience, США). After calibration of the device using BD FACSuite™ FC Beads-4c Research kit and BD FACSuite™ Research Beads (USA) tested samples were measured according to operational guidelines and measured cell

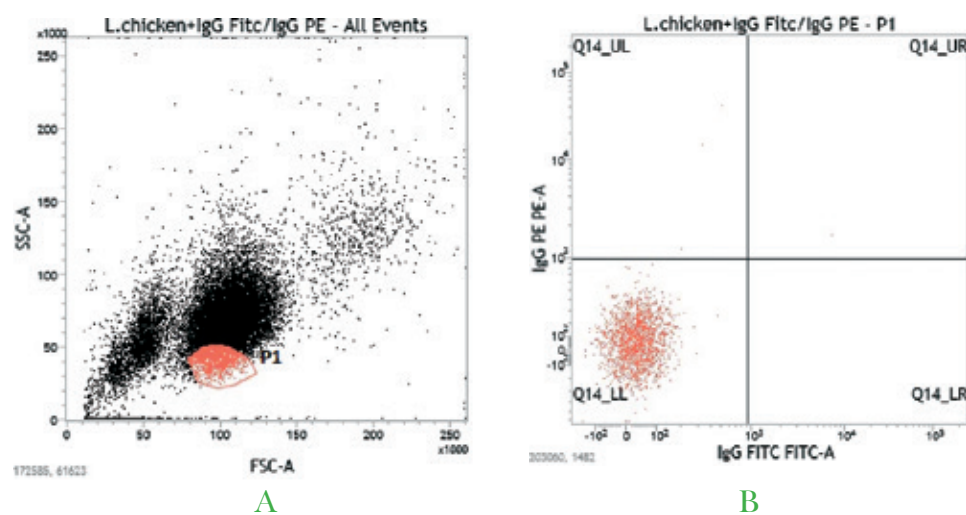


Fig. 2. Immunophenotypic tests of peripheral blood cells
A – lymphocyte gate extraction P1 in forward scattering and side scattering channels;
B – determination of quadrant boundaries for fluorescence detectors (FITC u PE) in conformance with the size of the isotopic control gate.

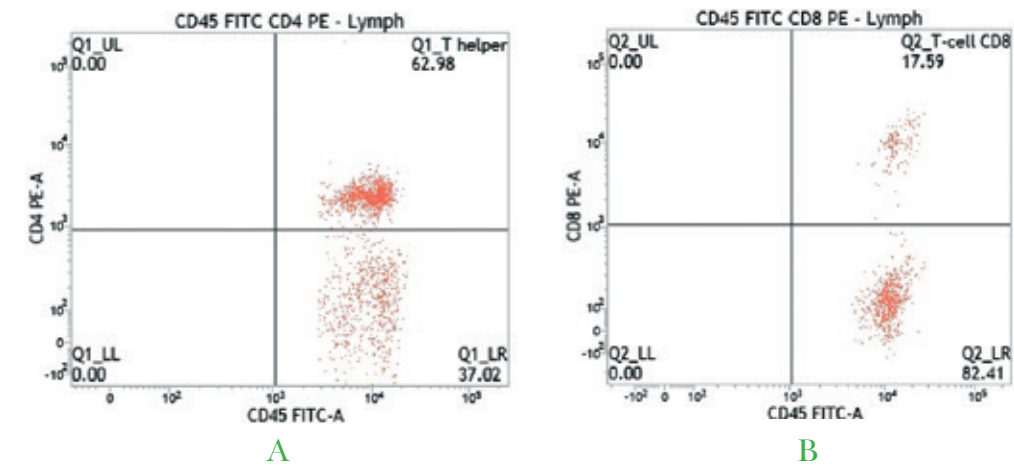


Fig. 3. Determination of basic T-lymphocyte subpopulations in chicken peripheral blood using monoclonal antibody combinations CD45FITC/CD4PE and CD45FITC/CD8PE
A – dot diagram showing CD45+CD4+ lymphocytes (T-helpers) in the right upper quadrant;
B – dot diagram showing CD45+CD8+ lymphocytes (T-cytotoxic lymphocytes) in the right upper quadrant.

populations were analyzed using BD FACSuite Software: Worklist Workflow or Expiration Workflow.

Experimental animals. 8–21 day old commercial broilers (15 birds) and 53–120 day old egg laying chickens (25 birds) were used for blood sampling.

Statistical result analysis. For statistic data analysis Statistica 6.0 was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of a method of identification of T- and B-lymphocytes in chickens and their subpopulations by flow cytometric analysis using BD FACSVerser™ several stages.

At the first stage it was necessary to determine the method of extracting lymphocyte gate of the cell subpopulation. According to publications there are several methods of lymphocyte gate extraction [1, 2]. Method of lymphocytic gate extraction with control of leukocyte common antigen CD45 and monocytic antigen expression was chosen by means of experiments (Fig. 1).

Maximum number of events are shown in upper left quadrant (gate P2) of diagram CD45 PE/CD monocyte/macrophage FITC.

The next stage was to select isotopic control for determination of markers of fluorescence intensity and non-specific staining. IgG FITC/IgG PE, containing labeled FITC и PE anti-mouse immunoglobulins G (IgG) (Fig. 2), was selected as an effective isotopic control.

According to publications antibody panels for lymphocyte immunophenotyping were designed and tested during studies of chicken cellular immune response:

- CD45FITC/CD3PE – T-lymphocytes;
- CD45FITC/CD4PE – T-helpers;
- CD45FITC/CD8PE – cytotoxic T-lymphocytes;
- TCRαβFITC /TCRγδPE – T-lymphocytes;
- CD45FITC/MHC-IIPE – B-lymphocytes, antigen-presenting cells;
- CD45FITC/Bu1PE – B-lymphocytes.

Fig. 3 demonstrates results of determination of basic T-lymphocyte subpopulations (CD4 and CD8) in chicken peripheral blood using selected antibody panels.

Specificity of the method was assessed by immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocytes conjugated to monoclonal antibodies to human, bovine, porcine and chicken cell surface markers (Fig. 4)

Positive events on dot diagram for PE/FITC were reported only for chicken lymphocytes conjugated to chicken CD45 and CD3 monoclonal antibodies.

Intra-laboratory reproducibility was assessed by immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocytes conjugated to chicken CD45, CD3, CD4 and CD8β monoclonal antibodies. The test was performed in four replicates. Test results are shown in Fig. 5

Coefficient of variation of the results for each cell population was not over 3%; difference between minimal and maximal values at 95% confidence level did not exceed 2% thus indicating reproducibility of the method [1, 2].

Subpopulations of immunocompetent cells in chicken peripheral blood and lymphoid organs were tested using the developed method. The results are shown in Tables 1–2.

The data demonstrate that percentage of basic populations of immunocompetent cells in broiler chicks included: T-helpers – 42–66% in blood and 25–35% in spleen; cytotoxic T-cells – 14–25% in blood and 20–31% in spleen. B-lymphocytes in broiler chicken bursa amounted to 78–99% (Table 1).

In egg laying chickens T-helpers amounted to 35–58% in blood and 19–35% in spleen. Percentage of cytotoxic T-cells amounted to 4,5–14% in blood and 25,5–40,5% in spleen. B-lymphocytes amounted to 5–20% in spleen and 1–7% in blood (Table 2).

The obtained results were consistent with percentage of the studied immunocompetent cell populations in chicken peripheral blood and lymphoid organs reported by the manufacturers of monoclonal antibodies intended for use in flow cytometry.

CONCLUSION

Therefore, specific and reproducible method for immunophenotyping of chicken blood and lymphoid organ cells by flow cytometry using BD FACSVerser™ was developed. The studies demonstrated that the developed method could be used for detection and assessment of different chicken lymphocyte populations and subpopulations.

REFERENCES

1. Medical laboratory technologies. Guide for Clinical Laboratory / ed. A.I. Karpischenko. – 3rd ed. – M.: GEOTAR-Media, 2013. – Vol. 2. – P. 274–314.

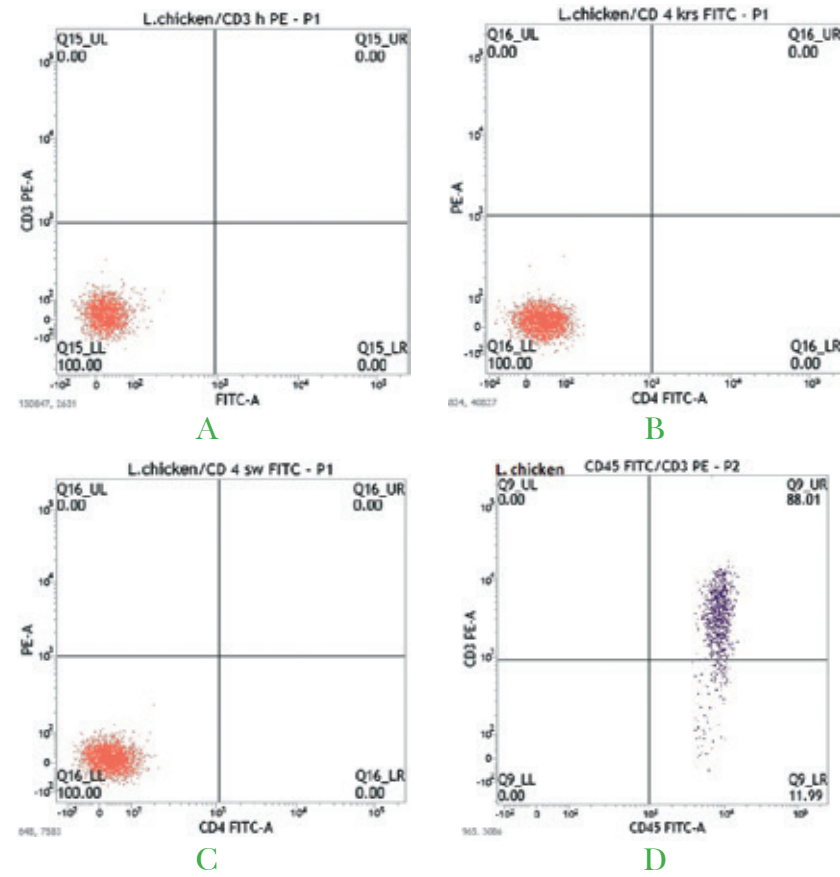


Fig. 4. Immunophenotyping of chicken peripheral blood cells
 A – dot diagram for chicken lymphocytes/ human CD3PE; 100% of CD3PE-/FITC- events are shown in left lower quadrant;
 B – dot diagram for chicken lymphocytes/ bovine CD4FITC; 100% of PE-/CD4FITC- events are shown in left lower quadrant;
 C – dot diagram for chicken lymphocytes/ porcine CD4FITC; 100% of PE-/CD4FITC- are shown in left lower quadrant;
 D – dot diagram for chicken lymphocytes/ chicken CD45FITC/CD3PE; 88.01% of CD45+FITC/CD3+PE cells (T-lymphocytes) are shown in right upper quadrant

2. Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshev V.A. Multi-color cytometric analysis. Identification of T-cells and their subpopulations by $\alpha\beta$ -TcR and $\gamma\delta$ -TcR expression // Medical Immunology. – 2008. – Vol. 10, № 2–3. – P. 115–124.
 3. Evaluation of CD45+ cells kinetics in the blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine / M. Popovic, M. Balenovic, A.E. Kabalin [et al.] // Veterinarski Arhiv. – 2010. – Vol. 80, № 1. – P. 61–69.
 4. Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution / T.S. Dalgaard, L.R. Norup, D. Rubbenstroth [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2010. – Vol. 138, № 1–2. – P. 85–94.
 5. Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges /

B.C.B. Beirao, C. Favoro Jr., L.S. Nakao [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2012. – Vol. 145, № 1–2. – P. 32–41.
 6. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability / Y. M. Fair, K.J. Taylor-McCabe, Y. Shou, B.L. Marone // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2008. – Vol. 125, № 3–4. – P. 268–273.
 7. Kapczynski D.R. Detection of cell-mediated immune response to avian influenza viruses / Animal Influenza Virus: Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1161. – P. 199–215.
 8. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens / B.W. Bridle, R. Julian, P.E. Shewen [et al.] // Can. J. Vet. Res. – 2006. – Vol. 70. – P. 183–190.

Table 1
 Immunophenotyping of lymphocytes of chicken broiler peripheral blood, bursa and spleen
 n=3

Age of birds, days	B-lymphocytes, %		T-lymphocytes, %		
	bursa	blood	spleen		
			CD45+Bu1a+	CD45+CD4+	CD45+CD8a+
8	80,91±2,88	45,41±3,38	16,14±1,57	25,93±4,38	22,49±0,3
10	96,43±1,4	49,5±1,12	13,68±0,39	29,32±1,2	24,93±4,74
13	97,26±0,02	59,39±6,53	18,15±1,73	30,32±5,47	21,25±0,18
16	94,11±2,06	50,06±4,36	20,1±4,17	30,14±2,81	23,55±3,78
21	97,08±0,98	46,29±2,91	20,06±4,67	29,81±5,08	26,07±5,22

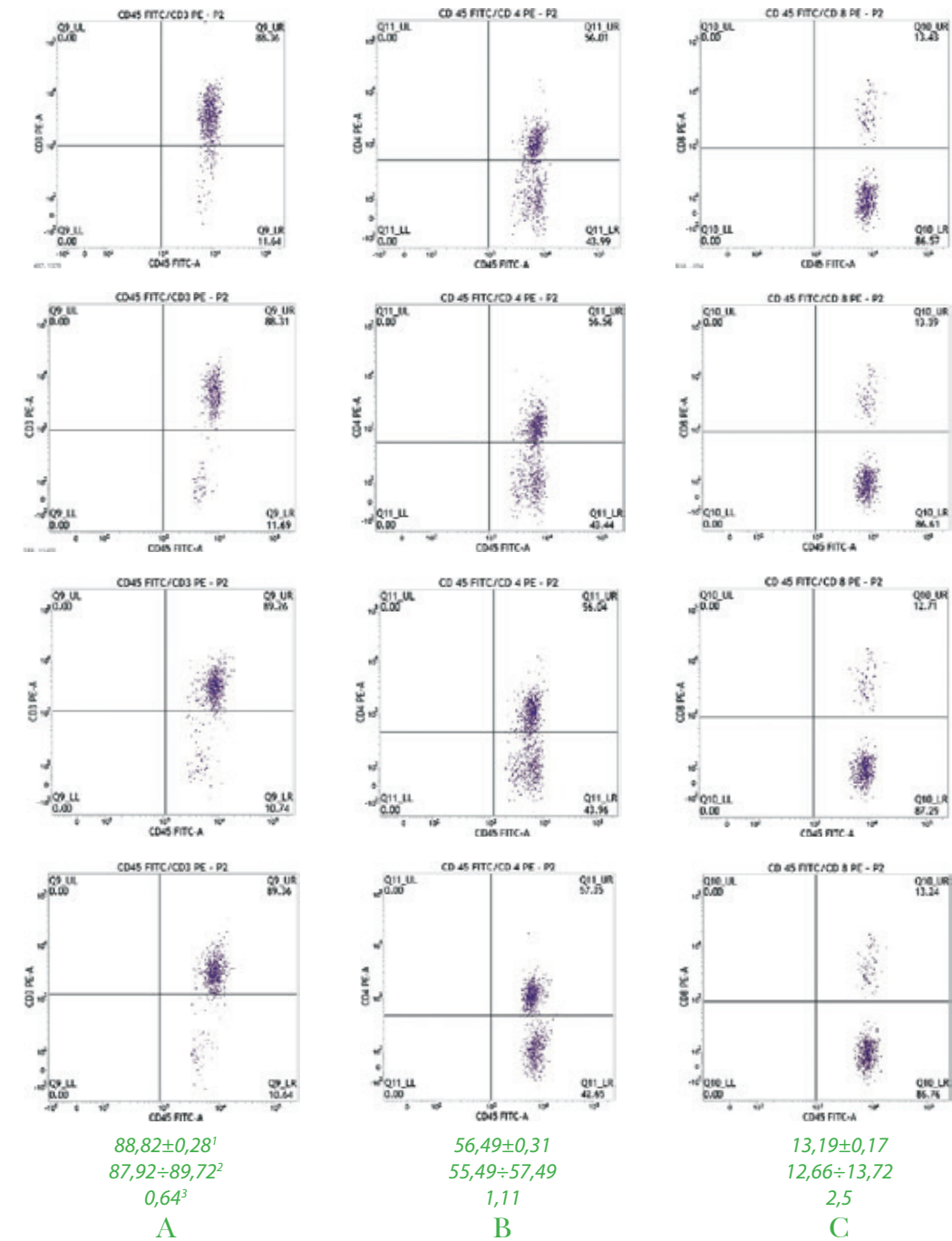


Fig.5 Immunophenotyping of chicken peripheral blood cells
 A – dot diagram for CD45FITC/CD3PE; CD45+CD3+ lymphocytes (T-lymphocytes) are shown in right lower quadrant
 B – dot diagram for CD45FITC/CD4PE; CD45+CD4+ lymphocytes (T-helpers) are shown in right lower quadrant
 C – dot diagram for CD45FITC/CD8PE; CD45+CD8+ lymphocytes (cytotoxic T-cells) are shown in right lower quadrant;
¹ mean value ± standard error of mean; ² 95% confidence level; ³ coefficient of variation.

Table 2
 Immunophenotyping of lymphocytes of egg laying chicken peripheral blood and spleen
 n=5

Age of birds, days.	B-lymphocytes, %		T-lymphocytes, %			
	blood	spleen	blood			
			CD45+MHCI1+	CD45+CD4+	CD45+CD8β+	CD45+CD4+
53	5,38±1,73	10,17±5,16	45,54±10,2	5,78±1,18	28,55±5,49	34,79±3,0
57	1,21±0,13	13,95±3,29	47,43±0,49	8,76±3,77	31,5±3,93	33,75±6,82
62	1,11±0,18	14,36±5,84	54,66±3,12	8,1±2,33	27,31±5,35	32,5±5,77
70	2,29±1,0	12,37±0,86	55,06±3,28	12,91±1,36	27,33±8,02	25,19±0,59
120	2,45±0,43	n/d	53,41±2,6	13,36±1,05	n/d	n/d



УДК 619:616-0024:616-078:639.3

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОГО НЕКРОЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

М.И. Доронин¹, В.А. Пыльнов², С.С. Рыбаков³¹ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru² старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир³ доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Получены латекс-агглютинационные препараты для выявления антител к вирусу инфекционного некроза гемopoэтической ткани лососевых рыб с аналитической чувствительностью 0,9 мкг/мл. При исследовании 40 сывороток крови в реакции агглютинации латекса диагностическая чувствительность и специфичность были равны 92 и 100% соответственно. Метод агглютинации латекса простой и быстрый в исполнении, может быть применен для ретроспективной диагностики заболевания и определения титра антител к вирусу в условиях ветеринарной лаборатории и даже рыбного хозяйства.

Ключевые слова: реакция агглютинации латекса, вирус инфекционного некроза гемopoэтической ткани, специфические антитела, аналитическая чувствительность, диагностическая специфичность и чувствительность.

UDC 619:616-0024:616-078:639.3

LATEX AGGLUTINATION TEST FOR RAPID DETECTION OF ANTIBODIES TO INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS OF SALMON

M.I. Doronin¹, V.A. Pylnov², S.S. Rybakov³¹ post-graduate student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru² senior researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir³ Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

Latex-agglutination preparations were produced for detection of antibodies to infectious hematopoietic necrosis virus of salmon with analytical sensitivity of 0,9 µg/ml. While testing 40 blood samples using latex-agglutination test the diagnostic sensitivity and specificity were 92 and 100%, respectively. The latex-agglutination is a simple and rapid test; it can be used for retrospective diagnostics of the disease and determination of the titer of antibodies to the virus under conditions of a veterinary laboratory and even a fish farm.

Key words: latex-agglutination test, infectious hematopoietic necrosis virus, specific antibodies, analytical sensitivity, diagnostic specificity and sensitivity.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный некроз гемopoэтической ткани (ИНГТ, ИН) — высококонтагиозное вирусное заболевание лососевых рыб, протекающее по типу эпизоотии и характеризующееся развитием септического процесса, тяжелым поражением органов гемopoэза, кровоизлияниями в органы и ткани, массовой гибелью молоди. Возбудитель принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Novirhabdovirus* (Murphy, 1999) [6]. Вирус ИНГТ вызывает эпизоотии как у выведенных в рыбоводствах (Williams and Amend, 1976), так и среди свободно обитающих лососевых рыб (Groberg and Fryer, 1983) [7]. В пресноводной аквакультуре вспышки заболевания регистрируют у нерки, чавычи, кеты, горбуши, симы, стальноголового лосося и радужной форели. Гольцы и кижуч считаются устойчивыми к заболеванию, но могут быть носителями вируса [6].

Вирус ИНГТ распространен по всему миру (Wolf, 1988). По данным Всемирной организации здравоохранения животных (OIE, МЭБ), в течение последних 10 лет было зарегистрировано около 100 вспышек ИНГТ в различных странах мира [6]. Эпизоотическая ситуация по данному заболеванию в нашей стране является довольно неблагоприятной. В 2000 г. в экспериментальном форелевом хозяйстве п. Рыбное Московской области у молоди радужной форели впервые возникла эпизоотия ИНГТ. Вирус был занесен в хозяйство с икрой неизвестного происхождения. В 2001 г. возбудителя регулярно выявляли у тихоокеанских лососевых, заходивших на нерест в реки Камчатки. В 2004 г. вирус ИНГТ обнаружили в ООО «Селекцентр» в г. Удомля Тверской области. В настоящее время приказом Министерства сельского хозяйства РФ данная вирусная инфекция отнесена к особо опасным заболеваниям. Болезнь представляет опасность не только для аквакультуры, но и для диких популяций лососевых рыб [5].

С целью укрепления безопасности страны в области рыболовства, а также сохранения биоразнообразия рыб в природе проводится масштабный контроль заболевания аквакультуры, важным звеном которого является эпизоотологический серомониторинг. В настоящее время разрабатываются различные диагностические методы, позволяющие контролировать иммунный статус аквакультуры и обеспечить биозащиту рыбоводных хозяйств. Серологические исследования сывороток, взятых от перенесших вирусную инфекцию лососевых рыб, проводят в летнее время, когда в крови появляются специфические антитела и вероятность выделения антигенов вируса ИНГТ незначительна. Поиск антител, специфичных к антигенам вируса ИНГТ, осуществляют с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток из гонад радужной форели (RTG-2), а также в иммуноферментном анализе (ИФА) [6]. При этом для перечисленных методов характерны весьма существенные недостатки — высокие требования к условиям постановки реакций, значительная трудоемкость при проведении и учете результатов анализа, наличие специально подготовленного персонала и высокий уровень оснащённости лаборатории.

В настоящее время в медицине и ветеринарной практике активно разрабатывают и применяют серологические методы, позволяющие повысить экспрессность и упростить проведение лабораторного исследования. К таким методам относят реакцию агглютинации

латекса (РАЛ), преимущество которой заключается в возможности применения для ретроспективной диагностики ИНГТ и определения титра сывороточных антител к антигенам вируса в условиях ветеринарной лаборатории и даже рыбоводческого хозяйства. Латексные препараты представляют собой гомогенные водные дисперсии унифицированных по размеру частиц латекса, поверхность которых в процессе физической адсорбции или ковалентного связывания сенсibilизирована биогликандами [2]. Создание латексных препаратов является сравнительно простой задачей, не требующей особых условий и глубокой методической подготовки. Стоимость исследования значительно ниже, чем при использовании других диагностических тестов. Реакция длится от 10 до 30 минут. При этом метод является достаточно чувствительным и специфичным, что позволяет получить достоверные результаты при оценке иммунного статуса рыбы. По своей диагностической чувствительности РАЛ значительно превышает иммунодиффузные тесты, реакцию преципитации в геле и встречный иммуноэлектрофорез и при использовании специальных анализаторов для учета степени агглютинации может конкурировать с иммуноферментным и радиоиммунным анализами. В отличие от иммунохроматографического метода, своего конкурента по скорости выполнения анализа, изготовление латексных препаратов технологически быстрее, проще и экономичнее [4]. Основным недостатком РАЛ является вероятность возникновения неспецифической агглютинации. Однако количество ложноположительных результатов минимизируют благодаря использованию положительных и отрицательных контролей и применению современных технологий изготовления латексных препаратов [3].

В настоящее время диагностические системы на основе РАЛ разрабатываются и широко используются как в медицинской, так и ветеринарной лабораторной диагностике. В ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) проводились исследования по разработке данного метода для диагностики других вирусных болезней, в частности бешенства животных [3].

Цель исследований — разработать метод выявления антител к антигену вируса ИНГТ и определения их титра в латекс-агглютинационном анализе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве антигена использовали вирус ИНГТ штамма «Аркус 32/87», репродуцированный в монослойной перевиваемой культуре клеток из гонад радужной форели (RTG-2) в среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов, с титром инфекционной активности 7,25 Ig ТЦД₅₀/мл. Полученную вирусную клеточную суспензию очищали и концентрировали так, как описано ранее [1].

В исследованиях использовали полистирольные частицы латекса с диаметром 340 нм, концентрацией -COOH, -NH₂, -SO₄ функциональных групп 1,98 мкг-экв/мл и содержанием сухого вещества 10% (ООО «Диафарм», г. Санкт-Петербург). Латексные препараты готовили по схеме, описанной в предыдущей работе [1]. Отмывание микросфер от компонентов сурфактанта проводили с помощью глицин-солевого буферного раствора (ГСБР) (ионная сила 5 мМ, pH 7,0, близкий к изоэлектрической точке иммуноглобулина класса G). Сенсibilизацию латексных частиц с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄-группами) проводили антигеном ви-

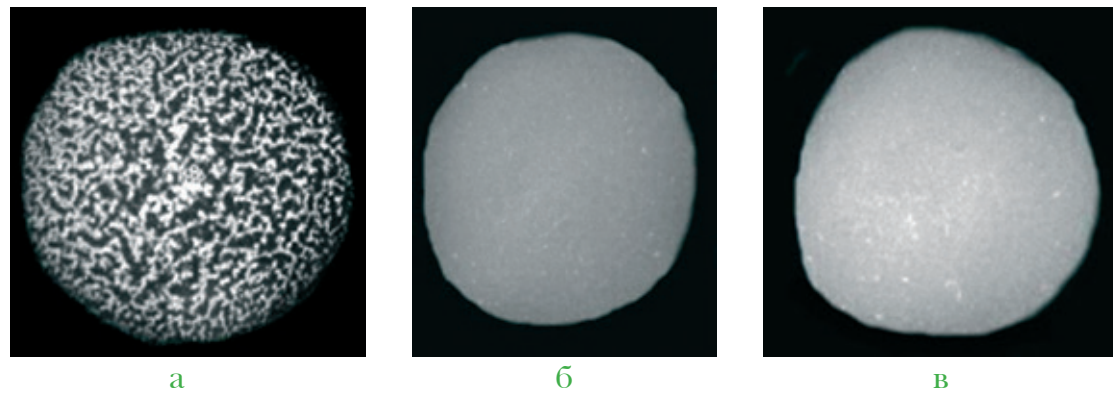


Рис. 1. Выявление антител, специфичных к антигенам вируса ИНГТ в реакции латекс-агглютинации
а — положительный контроль;
б — отрицательный контроль;
в — тест на неспецифическую агглютинацию.

руса ИНГТ с концентрациями 2000, 1000, 500, 250 мкг/мл. Для блокирования сайтов неспецифического связывания на поверхности частиц применяли глицин-белковый буферный раствор (ГББР), содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в ГСБР.

Степень адсорбции антигенов вируса ИНГТ на поверхности полистирольных латексных частиц с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄) определяли с использованием метода Лоури.

Концентрацию поликлональных антител к антигенам вируса ИНГТ определяли с помощью градуировочного графика (по 3 измерениям) на портативном многоканальном спектрофотометре (построение кривой проводили с использованием компьютерной программы Magellan for F50 V 7.0).

Таблица 1
Степень сенсibilизации антигенами вируса ИНГТ полистирольных частиц латекса с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄)
n=3

п/п №	Функциональная группа латексных частиц	Концентрация антигенов вируса ИНГТ до адсорбции, мкг/мл	Средняя концентрация адсорбированного вируса, мкг/мл	Степень адсорбции антигенов вируса, %	Степень сенсibilизации латексных частиц, %
1	-COOH	2000	711,33±0,06	35,57±0,05	100
2		1000	708,67±0,09	70,83±0,10	100
3		750	708,33±0,08	94,46±0,09	100
4		500	500	100	70,45±0,05
5		250	250	100	35,24±0,04
6	-NH ₂	2000	715,33±0,06	35,77±0,04	100
7		1000	714,33±0,08	71,37±0,07	100
8		750	714,17±0,09	95,22±0,14	100
9		500	500	100	69,71±0,20
10		250	250	100	34,85±0,10
11	-SO ₄	2000	699,05±0,05	34,95±0,07	100
12		1000	699,67±0,06	69,77±0,10	100
13		750	699,77±0,12	93,29±0,33	100
14		500	500	100	71,55±0,05
15		250	250	100	35,75±0,02

Количественную чувствительность полученных латексных препаратов определяли, используя суспензии поликлональных антител к антигенам вируса ИНГТ в ГСБР с концентрациями 30, 15, 7,5, 3,6, 1,8, 0,9, 0,45, 0,23 мкг/мл. Положительными и отрицательными контрольными препаратами служили сыворотки крови, содержащие и не содержащие антитела против антигенов вируса ИНГТ соответственно. Тест на неспецифическую агглютинацию проводили с помощью ГББР. Реакцию учитывали так, как описано ранее [6]. При агглютинации в 2–4 креста результат считали положительным, в 1 крест — сомнительным, а при отсутствии агглютинации — отрицательным. Учет РАЛ проводили в том случае, если с положительной контрольной сывороткой наблюдалась агглютинация на 3–4 креста (рис. 1а), а с отрицательной сывороткой (рис. 1б) и с ГББР агглютинация отсутствовала (рис. 1в).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали влияние концентрации антигенов вируса ИНГТ на степень сенсibilизации им полистирольных латексных частиц с разными функциональ-

ными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄). Результаты степени адсорбции антигенов и степени сенсibilизации полистирольных микросфер приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что при сенсibilизации латексных частиц антигенами с концентрациями 500 и 250 мкг/мл на поверхности микросфер адсорбировался весь белок, при этом возможно адсорбировать большее количество вируса, что подтверждали данные, полученные при использовании антигенов вируса с концентрациями 750, 1000 и 2000 мкг/мл. Было определено наибольшее количество антигенов вируса ИНГТ, при котором достигается плато изотермы адсорбции (рис. 2). Таким образом, путем количественного контроля адсорбции иммуноглобулина был оптимизирован процесс сенсibilизации латексов с разными ионогенными группами. Максимальная степень сенсibilизации микросфер с -NH₂-группой составляла 714,61±0,29 мкг/мл, с -COOH-группой — 709,44±0,77 мкг/мл, с -SO₄-группой — 699,60±0,52 мкг/мл. Наибольшее количество антигенов вируса ИНГТ адсорбировалось на поверхности аминированных частиц, наименьшее — на поверхности частиц с -SO₄-группами. Оптимальной концентрацией антигенов вируса ИНГТ для сенсibilизации латексов с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄), проявляющих лучшие показатели аналитической чувствительности, была выбрана 750 мкг/мл. Выявлена зависимость степени сенсibilизации латексных частиц с разными ионогенными группами от концентрации антигенов вируса ИНГТ и отражена в виде изотерм адсорбции (рис. 2).

Для более точной оценки диагностических возможностей синтезированных латексных препаратов опре-

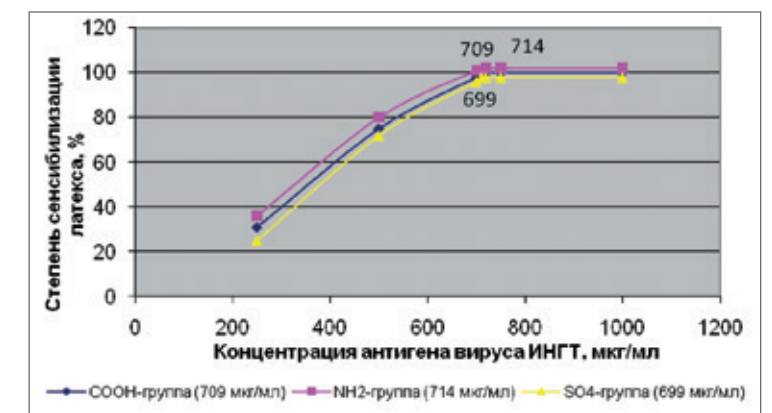


Рис. 2. Зависимость степени сенсibilизации латексных частиц с -COOH-, -NH₂-, -SO₄-группами от концентрации антигена вируса ИНГТ

деляли их аналитическую чувствительность, используя серию разведений поликлональных антител к антигенам вируса ИНГТ в ГСБР с диапазоном концентраций 30–0,23 мкг/мл (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что визуальный предел обнаружения на 2 креста поликлональных антител к антигенам вируса ИНГТ, при использовании аминированных латексов, сенсibilизированных 750 мкг антигенов/мл, составил 0,90 мкг/мл, латексных микросфер с -COOH- и -SO₄-группами с той же концентрацией антигенов — 1,80 мкг/мл при учете реакции через 10 минут. Аналогичные данные получены через 30 минут. Исследования показали, что для постановки РАЛ достаточно 10 минут. Лучшие показатели аналитической чувствительности полученных латексных препаратов отмечали при

Таблица 2
Аналитическая чувствительность латексных препаратов с -COOH-, -NH₂-, -SO₄-группами, сенсibilизированных антигенами вируса ИНГТ с разными концентрациями

Характеристика полистирольного латексного препарата				Интенсивность агглютинации (кресты) при разных концентрациях поликлональных антител, мкг/мл*							
функциональная группа	диаметр частиц, нм	концентрация антигенов вируса ИНГТ, мкг/мл	титр инфекционной активности вируса ИНГТ, lg ТЦД ₅₀ /мл	30	15	7,5	3,6	1,8	0,9	0,45	0,23
-NH ₂	340	2000	6,95	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		1000	6,65	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		750	6,50	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	0	0	0
		250	6,05	2+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
-COOH	340	2000	6,95	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		1000	6,65	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		750	6,50	4+	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	0	0	0
		250	6,05	3+	2+	2+	1+	1+	0	0	0
-SO ₄	340	2000	6,95	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
		1000	6,65	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
		750	6,50	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0	0
		500	6,35	4+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0
		250	6,05	2+	2+	2+	1+	0	0	0	0

* результаты исследований, проведенных 3 раза, были идентичны друг другу через 10 и 30 минут после начала постановки реакции.

Таблица 3
Результаты исследования в РАЛ и ИФА сывороток, содержащих антитела к антигенам вируса ИНГТ

№ сыв-ки	Результаты исследования в ИФА			Результаты исследования в РАЛ*		
	концентрация антител к антигенам вируса ИНГТ, мг/мл	титр антител к антигенам вируса ИНГТ, log ₂	+/-	титр антител к антигенам вируса ИНГТ, log ₂	интенсивность агглютинации (количество крестов)	положительный/сомнительный/отрицательный
1	1,90	10,6	+	10,6	2	положительный
2	3,50	11,6	+	11,6	3	положительный
3	1,40	10,6	+	9,6	2	положительный
4	2,10	10,6	+	10,6	2–3	положительный
5	6,90	12,6	+	12,6	4	положительный
6	7,10	12,6	+	12,6	4	положительный
7	2,30	10,6	+	10,6	2–3	положительный
8	1,80	10,6	+	10,6	2	положительный
9	1,70	10,6	+	10,6	2	положительный
10	3,30	11,6	+	10,6	3	положительный
11	3,90	11,6	+	11,6	3	положительный
12	2,10	10,6	+	10,6	2–3	положительный
13	1,60	10,6	+	9,6	2	положительный
14	1,80	10,6	+	10,6	2	положительный
15	7,10	12,6	+	12,6	4	положительный
16	1,20	10,6	+	9,6	2	положительный
17	3,00	11,6	+	11,6	3	положительный
18	3,50	11,6	+	11,6	3	положительный
19	1,00	10,6	+	7,6	1	сомнительный
20	0,90	10,6	+	6,6	0	отрицательный

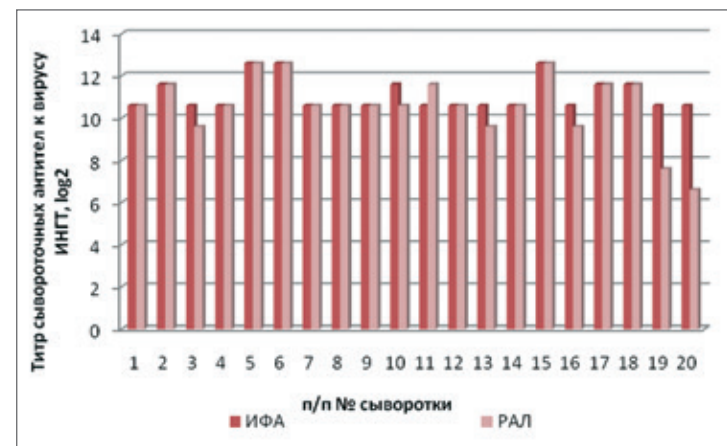
* результаты исследования в РАЛ одинаковы чрез 10 и 30 минут.

сенсibilизации микросфер антигенами вируса ИНГТ с концентрациями 750 мкг/мл и более. Достаточной для сенсibilизации латексных микросфер была выбрана концентрация антигенов вируса ИНГТ 750 мкг/мл (плата изотермы адсорбции для латексов с -NH₂-группами достигалось при 714,61±0,29 мкг антигенов/мл; для латексов с -COOH-группами — при 709,44±0,77 мкг антигенов/мл; для латексов с -SO₄-группами — при

699,60±0,52 мкг антигенов/мл). С повышением концентрации антигенов вируса ИНГТ степень адсорбции белка и аналитическая чувствительность синтезированных латексных препаратов не изменялись (0,90 мкг/мл антител — для аминированных латексов, 1,80 мкг/мл антител — для латексных микросфер с -COOH- и -SO₄-группами). При уменьшении концентрации антигенов значения степени его адсорбции и аналитической чувствительности латексных препаратов снижались. Таким образом, сенсibilизированные антигенами вируса ИНГТ аминированные латексные частицы позволяли выявлять специфические антитела в сыворотках крови с концентрацией иммуноглобулинов класса G 0,90 мкг/мл и более.

Оценку диагностической чувствительности и специфичности синтезированных латексных препаратов проводили, исследуя 20 позитивных и 20 негативных сывороток крови для выявления антител к антигенам вируса ИНГТ. В эксперименте использовали серию разведенных сывороток в диапазоне 1:100–1:12800 в ГСБР. Постановку РАЛ и учет результатов реакции проводили, как описано выше. В РАЛ применяли аминированный латексный препарат, сенсibilизированный антигенами вируса ИНГТ с концентрацией 750 мкг/мл, который проявил лучшие диагностические характеристики. Параллельно проводили тестирование сывороток крови в непрямом варианте ТФ ИФА. Со всеми 20 сыворотками, не содержащими специфические антитела, в РАЛ

Рис. 3. Корреляция между результатами по определению титров сывороточных антител к антигенам вируса ИНГТ в ИФА и РАЛ



отмечалось отсутствие агглютинации. Таким образом, диагностическая специфичность латексного препарата, полученного на основе аминированных микросфер с диаметром частиц 340 нм и концентрацией функциональных групп 1,98 мкг-экв/мл, составила в РАЛ — 100%.

При исследовании 20 положительных в ИФА сывороток крови в РАЛ 18 были положительными, 1 — сомнительной и 1 — отрицательной (табл. 3). Диагностическая чувствительность аминированного латексного препарата в РАЛ составила 92%.

Используя методы ИФА и РАЛ, были определены титры сывороточных антител к антигенам вируса ИНГТ при исследовании 20 позитивных сывороток в диапазоне разведений 1:100–1:12800. По сравнению с ИФА в РАЛ 14 образцов показали те же титры антител, в то время как у 6 сывороток (№№ 3, 10, 13, 16, 19, 20) значения титров были ниже (рис. 3).

Анализируя данные табл. 3, можно выделить 3 группы исследуемых сывороток по диагностическому критерию, позволяющему точно интерпретировать результаты РАЛ. Положительная группа — сыворотки, вызывающие агглютинацию на 2–4 креста, содержащие антитела к антигенам вируса ИНГТ, с концентрацией 0,90 мкг/мл и более, что соответствует установленному пределу аналитической чувствительности полученных латексных препаратов. Сомнительная группа — сыворотки, которые вызывают агглютинацию на 1 крест и содержат антитела к антигенам вируса ИНГТ, с концентрацией ниже 0,90 мкг/мл и являющиеся положительными в ИФА. Отрицательная группа — сыворотки, не проявляющие агглютинацию, содержащие антитела с концентрацией ниже 0,90 мкг/мл и отрицательные по результатам ИФА.

Полученные латексные препараты с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄), сенсibilизированные антигенами вируса ИНГТ с концентрацией 750 мкг/мл, испытывали в РАЛ с неспецифичными антителами (к антигенам вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV, Infectious pancreatic necrosis, *Aquabirnavirus*), к антигенам вируса весенней виремии карпа (SVCV, *Rhabdovirus carpio*, *Vesiculovirus*), к антигенам вируса геморрагической септицемии (VHSV, *Viral haemorrhagic septicaemia*, *Novirhabdovirus*)). Положительными и отрицательными контрольными препаратами служили сыворотки крови, содержащие и не содержащие антитела против антигенов вируса ИНГТ соответственно. Латекс-агглютинационный анализ проводили, как описано выше, учет результатов осуществляли визуально через 10 минут (первично), через 30 минут (вторично) после постановки реакции (табл. 4).

Таблица 4
Результаты исследования сывороток, содержащих неспецифичные антитела, с применением латексных препаратов, сенсibilизированных антигенами вируса ИНГТ*

Функциональные группы латексных препаратов	Результаты теста на неспецифическую агглютинацию	Контроль отрицательный	Контроль положительный	Неспецифичные антитела против антигенов вирусов		
				IPNV	VHSV	SVCV
-COOH	отрицательный	0	4+	0	0	0
-NH ₂	отрицательный	0	4+	0	0	0
-SO ₄	отрицательный	0	4+	0	0	0

* интенсивность агглютинации выражена в количестве крестов (0–4).

Из табл. 4 видно отсутствие агглютинации латексных препаратов с неспецифичными сыворотками, что свидетельствовало о высокой степени специфичности теста по отношению к антителам, нейтрализующим антигены вируса ИНГТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были определены параметры оценки степени сенсibilизации латексных частиц с разными функциональными группами (-COOH, -NH₂, -SO₄) с использованием спектрофотометрического метода. Была определена аналитическая чувствительность синтезированных латексных препаратов, выявляющих антитела к антигенам вируса ИНГТ, разработаны условия проведения РАЛ и критерии оценки полученных результатов. Метод позволяет ретроспективно выявлять случаи ИНГТ, определять титр антител к указанному вирусу не только в рыбоводческих хозяйствах, но и в дикой природе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метод латекс-агглютинации для выявления антигенов вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых / М.И. Доронин, В.А. Пыльнов, С.С. Рыбаков, Н.А. Назаров // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 56–61.
2. Мешандин А.Г., Матвеев А.Г. Латексные тест-системы — основа для создания бесприборных диагностических комплексов // Труды раб. совещ. «Состояние диагностики бактериальных инфекций». — Оболонск, 1989. — 143 с.
3. Назаров Н.А., Рыбаков С.С., Метлин А.Е. Латекс-агглютинационный тест для диагностики бешенства животных // Ветеринария. — 2013. — № 6. — С. 56–61.
4. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований // Лаборатория. — 2006. — № 1. — С. 19–22.
5. Щелкунов И.С. Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб // Ветеринария. — 2006. — № 4. — С. 22–25.
6. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals / OIE. — 6nd ed. — Paris, France, 2009. — Vol. 1. — 383 p.
7. McAllister. P.E. Fish viruses and viral infections // Comprehensive Virology / ed. H.F. Conrat, R.R. Wagner. — New York, 1979. — Vol. 14. — P. 401–470.

АНАЛИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В МИРЕ ПО ВИРУСНЫМ БОЛЕЗНЯМ РЫБ

Д.К. Павлов¹, А.А. Пичуева²

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

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

РЕЗЮМЕ

Эпизоотическая ситуация в мире по болезням аквакультуры актуальна для нашей страны, так как данная информация позволяет представить риск распространения инфекций между странами и определить эффективность необходимых мероприятий, направленных на недопущение этих заболеваний на территории сопредельных и других государств. Основой рационального планирования и эффективного осуществления мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями рыб является эпизоотологический мониторинг.

Ключевые слова: аквакультура, вирусная геморрагическая септицемия лососевых, инфекционный некроз гемопоэтической ткани, инфекционный некроз поджелудочной железы, инфекционная анемия лососевых, вирусная виремия карповых, кои-герпесвириоз.

ANALYSIS OF FISH VIRAL DISEASE EPIDEMIC SITUATION WORLDWIDE

D.K. Pavlov¹, A.A. Pichuyeva²

¹ leading researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pavlov_dk@arriah.ru

² senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The epidemic situation on aquaculture diseases worldwide is of relevance for our country as this information makes it possible to imagine a risk of infection spread among countries and to determine effectiveness of necessary measures aimed at prevention of these diseases spread in territories of neighboring and other countries. The epidemiological monitoring is the basis for rational planning and effective arrangement of measures for controlling fish infectious diseases.

Key words: aquaculture, viral haemorrhagic septicemia of salmon, infectious hematopoietic necrosis, infectious necrosis of pancreatic gland, infectious anaemia of salmon, viral viremia of carps, koi herpesvirus disease.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопросам рыбной промышленности уделяется повышенное внимание. Самым крупным производителем аквакультуры является Российская Федерация. Этому способствуют большие площади естественных водоемов, водохранилищ и прудов. Как показывает мировой опыт промышленного разведения рыбы, интенсификация аквакультуры связана с проявлением многих проблем, одной из которых являются вирусные болезни рыб.

В списке особо опасных и опасных болезней Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) из девяти болезней рыб — шесть инфекций вирусной этиологии. К ним относятся: вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз поджелудочной железы, инфекционный некроз гемопоэтической ткани, инфекционная анемия лососевых, вирусная (или весенняя) виремия карповых и кои-герпесвириоз карповых. Эпизоотии данных заболеваний приводят к громадным экономическим потерям в хозяйствах аквакультуры.

Своевременное информирование об эпизоотической ситуации в странах, граничащих с Россией, чрезвычайно важно, так как каждая из стран в любой момент может выступить потенциальным источником особо опасных болезней.

В связи с этим возросла роль направлений эпизоотологии, изучающих особенности и закономерности мирового распространения и проявления инфекционных болезней в различных природных и социально-экономических условиях с целью оценки эпизоотического риска и рационализации систем противоэпизоотических мероприятий.

В статье приведен анализ современной эпизоотической ситуации по основным болезням рыб за 2011–2014 гг.

Инфекционная анемия лососевых впервые была обнаружена в одном из хозяйств юго-западной части Норвегии. Болезнь распространилась более чем на 100 рыбоводных фермах. Она считается одной из наиболее опасных для атлантического лосося и наносит значительный ущерб его товарному производству [5].

Обычно заболевание развивается у постсмолтов (год и старше) спустя некоторое время после перевода их на морскую воду. Гибель составляет 50%, но иногда достигает 100%. Полагают, что проходная кумжа (*Salmo trutta* L.) и радужная форель (*Salmo irideus*) формируют резервуар инфекции в море. При экспериментальном заражении эти рыбы не заболели, но значительное время (кумжа более 7 мес.) являлись вирусносителями и передавали заболевание подсаженному на контакт атлантическому лососю [2].

Переносчиками вируса являются копеподы *Caligus elongatus* и *Lepeophtheirus salmonis*, паразитирующие на поверхности тела лососей. В естественных условиях воротами инфекции являются жабры, далее вирус проникает во внутренние органы рыб, поражая главным образом клетки эндотелия кровеносных сосудов, клетки гемопоэтической ткани почек и лимфоциты. Он обнаруживается в крови, слизи и содержимом кишечника.

На морских лососевых фермах Норвегии для борьбы с паразитирующими на лососе копеподами практикуется подсадка к нему местного губана (*Labridae*), поскольку последний использует их в пищу. Это можно рассматривать и как биологический способ профилактики заболевания [5].

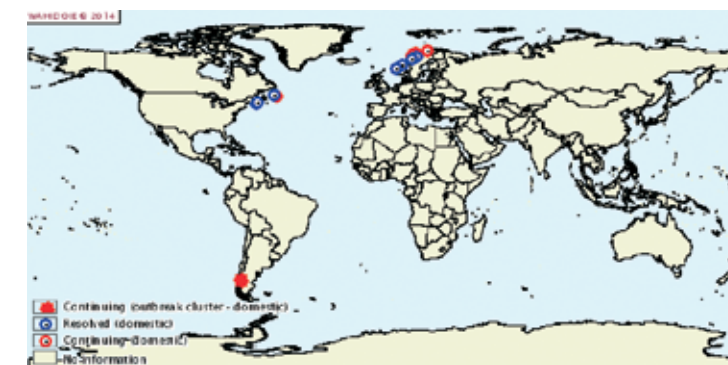


Рис. 1. Очаги распространения инфекционной анемии лососевых

На рис. 1 представлено распространение инфекции с 2011 по 2014 гг. [12].

По данным МЭБ, в 2011 г. были зарегистрированы вспышки инфекционной анемии лососевых в Шотландии (2 вспышки на юго-западе острова Мэрленд и 2 на Шетландских островах), в 2013 г. — на территории Канады (3 вспышки), Норвегии (7 вспышек), в 2014 г. — в Чили (1 вспышка), Канаде (1 вспышка) и Норвегии (11 вспышек).

Кои-герпесвириоз впервые был зарегистрирован на территории Великобритании в 1996 г. С весны 1998 г. болезнь стала быстро распространяться и к концу 2009 г. отмечалась в 30 странах.

Молекулярно-генетическими исследованиями установлены 6 европейских (E1–E6) и 2 азиатских (A1–A2) генотипа вируса. К заболеванию восприимчивы все возрастные группы карпа, кроме личинки. Заболевание наиболее тяжело протекает при температуре воды 17–26 °C и характеризуется неравномерным окрашиванием кожи, разрушением плавников, западением глаз [7–9].

Острое и сверхострое течение болезни сопровождается 100%-ной заболеваемостью и гибелью до 90–100% рыб. При этом между появлением первых признаков заболевания и гибелью рыб может пройти всего несколько часов.

Рис. 2. Очаги распространения кои-герпесвириоза карповых





Рис. 3. Очаги распространения вирусной виремии карпа в 2011–2014 гг.

Основной способ профилактики болезни — завоз рыбы из благополучных хозяйств. Импортные поставки рыбы должны сопровождаться ветеринарными сертификатами установленного образца, где должно быть указано, что хозяйство-поставщик в стране-экспортере находится под регулярным диагностическим надзором, осуществляемым в соответствии с положениями МЭБ, и свободно от возбудителя данной болезни. Несмотря на это, импортируемые рыбы следует держать на карантине в течение 3–4 недель [9, 10].

На рис. 2 отображено распространение инфекции в период 2011–2014 гг. [12].

В 2011 г. кои-герпесвирус был зарегистрирован в Швеции, Румынии, Франции, Финляндии; в 2012 г. — в Швеции, Румынии и Испании; в 2014 г. заболевание отмечалось на территории Молдавии.

Вирусная (весенняя) виремия карпа впервые была описана в Югославии (1972 г.). Болезнь распространена

Рис. 4. Очаги распространения инфекционного некроза гемопоэтической ткани



в большинстве европейских стран с развитым карповодством, зарегистрирована в США (с 2002 г.) и странах Юго-Восточной Азии (в 2004 г. была выявлена в Китае). В последние годы наблюдается тенденция к глобализации инфекции [2].

Наиболее остро болезнь протекает при температуре воды 11–17 °С и затухает при повышении ее до 20 °С и выше. При температуре 5–10 °С инфекция протекает хронически, но гибель может достигать 100%.

Заболевание распространено в европейских странах с развитым карповодством, для которых свойствен достаточно продолжительный зимний период низких температур. Основным путем распространения болезни являются межхозяйственные перевозки живой рыбы, в том числе декоративных карповых рыб. Воротами инфекции являются жабры, вероятно, интактные кожные покровы и начальный отдел пищеварительного тракта. Первыми признаками заболевания являются анорексия и угнетение рыб, которые скапливаются на мелководных участках пруда и приобретают темную окраску тела [2, 5].

Заболевание протекает в острой, хронической и нервной формах. При острой форме у больных рыб отмечают очаговое, или диффузное, ерошение чешуи, увеличение брюшка, точечные кровоизлияния (петехии) на брюшной поверхности, у основания плавников, разрушения межлучевой ткани плавников, кровоизлияния в чешуйные кармашки и серповидное кровоизлияние в глазное яблоко. Жабры анемичны (иногда почти серые) с петехиями. Переболевшая рыба приобретает стойкий иммунитет, в крови появляются антитела, уровень и продолжительность циркуляции которых определяются напряженностью инфекционного процесса. Вирусная виремия карпа наносит ощутимый ущерб вследствие потерь от гибели рыб и больших затрат на оздоровление хозяйств [5, 6].

По данным МЭБ вирус весенней виремии карпа был зарегистрирован в Англии в 2011 и в 2014 гг. (рис. 3) [12].

Вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани впервые был описан в 50-х гг. у нерки на рыбозаводных заводах на западном побережье США [3]. Позже это заболевание было зарегистрировано у



чавычи в Калифорнии и у радужной форели и нерки в Британской Колумбии, а также в Европе и Юго-Восточной Азии. В настоящее время инфекционный некроз гемопоэтической ткани представляет серьезную проблему для искусственного воспроизводства лососевых рыб в США и Канаде. В России это заболевание впервые обнаружено в 2000 г. у искусственно выращиваемой молоди радужной форели. В 2001 г. оно было зарегистрировано на Камчатке у производителей нерки [1, 2, 4, 11].

Вспышки инфекционного некроза гемопоэтической ткани рыб наблюдаются при температуре воды 8–10 °С у молоди рыб после рассасывания желточного мешка и особенно у рыб в возрасте 5–6 мес. Инкубационный период у сеголетков 7–12 сут. Рыба вялая, не реагирует на звук и прикосновение; иногда совершает резкие плавательные движения на боку по кругу, чередующиеся с неподвижностью. Кожный покров темнеет, жабры бледнеют. Появляются вздутие брюшка и иногда пучеглазие, кровоизлияния у оснований плавников и в области глотки, отеки позади головы и жаберных крышек. При вскрытии обнаруживаются кровоизлияния на плавательном пузыре, брюшине и в забрюшинном жире. Желудок наполнен молочной слизью, на стенке кишок — петехии, в почках и печени — очаги некроза [1, 2, 5]. При вспышке заболевания в искусственных условиях смертность рыб нередко достигает 100% [12].

Очаги инфекции отмечались в 2012 г. на территории Канады и Норвегии, а в 2014 г. — на территории Хорватии, что представлено на рис. 4 [12].

Вирусная геморрагическая септицемия является одной из наиболее опасных болезней рыб, поражающих культивируемых и диких пресноводных и морских рыб разного возраста. Инфекция впервые была установлена в 1962 г. в форелеводческих хозяйствах Дании. Болезнь широко распространена в европейских странах с развитым форелеводством. Отмечена на территориях Норвегии, Швеции, Финляндии, США, Канады, Японии и представляет потенциальную опасность для России. Появление этой болезни в нашей стране связано с завозом оплодотворенной икры из зарубежных хозяйств, неблагополучных по вирусной геморрагической септицемии [2, 5].

Болезнь наносит большой экономический ущерб за счет массовой гибели молоди и товарной форели (до 90%). В теплое время года болезнь, как правило, протекает латентно, но при неблагоприятных условиях содержания и кормления рыб она может проявляться клинически и летом при температуре воды 11–20 °С. Вирусной геморрагической септицемией поражается форель в возрасте до одного года при размере рыб 5–7 см [1, 2, 6].

Болезнь протекает в трех формах. Острое течение характеризуется быстрым развитием патологического процесса и высокой смертностью. У больных рыб наблюдают темно-коричневое окрашивание поверхности тела и одно- или двустороннее пучеглазие, анемию и геморрагические полосы на жабрах. Основания плавников имеют красноватую окраску. Хроническому течению свойственны умеренное развитие болезни и невысокая смертность. Окраска тела больных форелей темная или почти черная, отмечается сильно выраженная экзофтальмия, а также анемия: жабры при этом имеют светло-розовую или беловато-серую окраску, а в некоторых случаях они совершенно белые. Иногда регистрируют водянку брюшной полости. Нервная

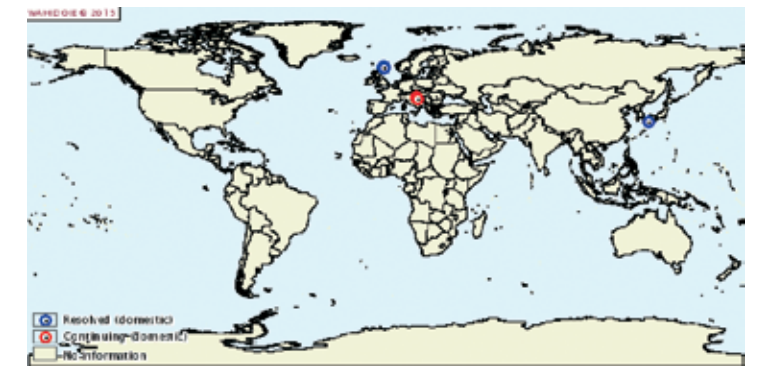


Рис. 5. Очаги распространения вирусной геморрагической септицемии в 2011–2014 гг.

форма проявляется своеобразным поведением больных особей: рыбы совершают спиралеобразные движения у дна бассейна или против течения, иногда плавают кругами на боку. У них наблюдают спазматические и внезапные подергивания телом. С развитием болезни число заболевших рыб резко снижается, гибель бывает незначительной [1, 2, 5].

Вспышки вирусной геморрагической септицемии отмечались в 2013 г. на территории Шотландии, Хорватии и Японии, а в 2014 г. — на территории Хорватии и Словении (рис. 5) [12].

Инфекционный некроз поджелудочной железы впервые был зарегистрирован в форелевых хозяйствах США у сеголетков палии. В настоящее время болезнь распространена на прилегающих к Тихому океану территориях США и Канады (от Аляски до Калифорнии), в Японии, Китае, Южной Корее и на Тайване. Встречается во Франции, Италии, Германии, Бельгии и России [12]. Кроме того, возбудитель вместе с икрой из Северной Америки был завезен в Чили. Вирус выявляется в морских областях Финляндии ежегодно, но до настоящего времени он редко выявлялся во внутренних водах страны [1, 2, 13].

Болезнь передается и горизонтально через воду, и вертикально через икру, переболевшие рыбы на протяжении всей жизни являются вирусносителями. Сезонную закономерность инфекционного некроза поджелудочной железы невозможно определить однозначно, так как в зависимости от температуры источника водоснабжения болезнь может проявляться в течение осени, зимы и весны, то есть в то время года, когда происходит выклев личинок молоди лососевых рыб и перевод их на искусственное кормление [1, 2].

Наибольшее количество вспышек инфекционного некроза поджелудочной железы — 64 очага за 2012 г. и 33 вспышки в 2013 г. — было отмечено на территории Норвегии (рис. 6) [12]. В связи с чем Департамент рыболовства и прибрежных дел ввел новые требования с целью ограничения распространения болезни, вызванной вирусом серовара SAV2 в центральной Норвегии.

Целью норвежской стратегии по контролю инфекционного некроза поджелудочной железы являлась минимизация последствий болезни на западном побережье Норвегии, где болезнь получила широкое распространение, и предотвращение ее распространения на север. В случае выявления заболевания севернее Хустадвика садки на неблагополучной ферме немедленно опустошались.

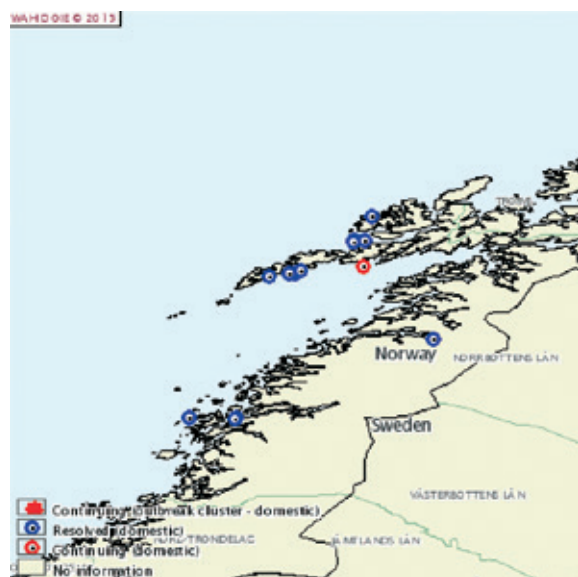


Рис. 6. Очаги распространения инфекционного некроза поджелудочной железы на территории Норвегии с 2011 по 2014 гг.

Новые требования включают ежемесячную проверку и мониторинг здоровья рыб. Также внедряются высокие стандарты охраны здоровья рыб для предотвращения дальнейшего распространения инфекционного некроза поджелудочной железы [13].

Вирус инфекционного некроза поджелудочной железы серовара SAV2 является относительно новым для аквакультуры Норвегии. Однако этот серовар уже привел к значительным потерям в других странах, в том числе Шотландии.

В течение 2012 г. во всех случаях выявлялся вирус одного штамма, который отличался низкой вирулентностью. Несмотря на то, что рыба являлась носителем вируса, болезнь не обязательно проявлялась клинически. При этом среди зараженной рыбы не отмечалось значительного повышения смертности.

Вирус легко распространяется на различные виды рыб и других морских организмов и обладает устойчивостью в окружающей среде [6].

Оздоровить предприятия по выращиванию аквакультуры от вируса необычайно сложно, так как возбудитель менее чувствителен к дезинфектантам.

Наряду с данными заболеваниями широкое распространение получило заболевание лососевых — **синдром кардиомиопатии**. В Норвегии отмечается увеличение числа случаев диагностированного синдрома кардиомиопатии лососевых. В период с 2011 по 2013 гг. число таких случаев возросло почти в 2 раза. Синдром кардиомиопатии лососевых — это тяжелое заболевание сердца, поражающее лосося в морской воде. В 2010 г. исследователи из Национального ветеринарного института и Норвежской школы ветеринарных наук во взаимодействии с компанией Pharmax выделили вирус, вызывающий синдром кардиомиопатии лососевых, который назвали Piscine myokarditt virus (PMCV — вирус миокардита рыб). Патогенез заболевания на данный момент еще не изучен [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя ситуацию за последние четыре года, следует отметить, что инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз поджелудочной железы, кои-герпесвироз стабильно вызывают вспышки данных заболеваний в наиболее развитых по аквакультуре странах, нанося при этом значительный экономический ущерб предприятиям.

Эпизоотическая ситуация в мире по вирусным заболеваниям рыб остается напряженной, особенно в странах, граничащих с Российской Федерацией (Норвегия, Финляндия). Обеспечение контроля над данными болезнями на территории России, особенно в период ввоза посадочного материала из неблагополучных по вирусным заболеваниям стран, является главной стратегией государственных органов в сфере ветеринарии с целью сохранения дальнейшего благополучия. А организация эпизоотологического мониторинга позволит упорядочить диагностику инфекционных болезней рыб и повысить эффективность оздоровительных мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезни рыб: справочник / Г.В. Васильев [и др.]; под ред. В.С. Осетрова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1989. — 288 с.
2. Болезни рыб: справочник / под ред. В.С. Осетрова. — М.: Колос, 1978. — 351 с.
3. Рудакова С.Л. Анализ развития эпизоотии, вызванной вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV) у мальков нерки *Oncorhynchus Nerka* при искусственном выращивании (Камчатка) // Вопросы рыболовства. — 2004. — Т. 5. — № 2 (18). — С. 362–374.
4. Рудакова С.Л. Некроз гемопоэтической ткани у производителей нерки и предполагаемые источники инфекции // Вопросы рыболовства. — 2003. — Т. 4. — № 1 (13). — С. 93–102.
5. Рыбоводство. Болезни рыб. — URL: <http://pisciCulture.ru/disease>.
6. Aquatic Animal Health Code / OIE. — 17th ed. — Paris, France, 2014. — 277 p.
7. Infectious hematopoietic necrosis (IHNV): the first confirmed finding in Russia // I.S. Shchelkunov [et al.] // Diseases of Fish and Shellfish. — Dublin, 2001. — P. 44.
8. Occurrence of and responses to KHV outbreaks in Japan / M. Sano [et al.] // KHV Infection: Present Status and Future Prospects for Prevention. — Tokyo, Japan. — 2004. P. 17–19.
9. Status of koi herpesvirus disease in Europe, and research on the virus in the United Kingdom / P.F. Dixon [et al.] // KHV Infection: Present Status and Future Prospects for Prevention. — Tokyo, Japan. — 2004. — P. 5–7.
10. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture / O.L.M. Haenen [et al.] // Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. — 2004. — Vol. 24. — P. 293–307.
11. Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. — Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1988. — 476 p.
12. <http://www.oie.int/wahis>.
13. <http://www.thefishsite.com/fishnews>.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

Редакция «Ветеринария 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)

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



Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvecь,
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>