

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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

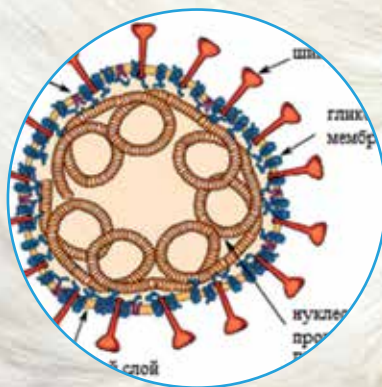
РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY TODAY RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



**ВСПЫШКА
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА
ПТИЦ H5N1 НА ТЕРРИТОРИИ
АЛТАЙСКОГО КРАЯ
В 2014 Г.: ПРИЧИНЫ И ОПЫТ
ЛИКВИДАЦИИ**
стр. 62

**H5N1 HIGHLY PATHOGENIC
INFLUENZA IN ALTAYSKY KRAI
IN 2014: CAUSES AND
ERADICATION**
p. 62



**ТКАНЕВОЙ ТРОПИЗМ
И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА
КУР (ОБЗОР)**
стр. 48

**TISSUE TROPISM AND
CLINICAL MANIFESTATION
OF CHICKEN INFECTIOUS
BRONCHITIS (REVIEW)**
p. 48



**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ
p30, pK205R И pB602L
В СЕРОДИАГНОСТИКЕ
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**
стр. 37

**USE OF p30, pK205R
AND pB602L RECOMBINANT
PROTEINS FOR AFRICAN SWINE
FEVER SERODIAGNOSIS**
p. 37

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

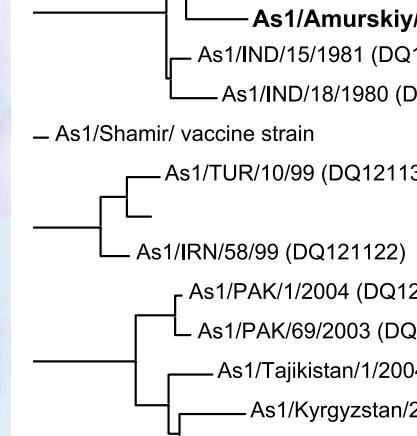
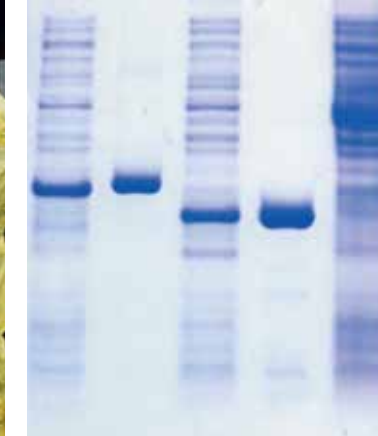
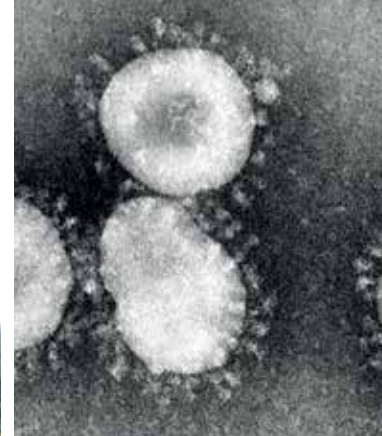


Ведущий центр разработчиков и производителей ветеринарных препаратов для профилактики и диагностики болезней птиц, свиней и рогатого скота (производится более 100 наименований вакцин и около 50 наименований диагностических наборов).

- 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. Юрьеvec
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 №3 (14) 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. 22-27

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

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

– **Власов Н.А.** – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, г. Москва;

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

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

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

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

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

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

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

– **Непоклонов Е.А.** – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору; г. Москва;

– **Пивовар В.П.** – директор Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия, главный государственный инспектор Республики Беларусь, г. Минск;

– **Плющиков В.Н.** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, декан РУДН, г. Москва;

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

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

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

– **Самуйленко А.Я.** – академик РАН, профессор, директор ФГБНУ ВНИИТБП, г. Щелково;

– **Сисягин П.Н.** – член-корреспондент РАН, профессор, директор ФГБНУ НИВИ ИЗ России, г. Нижний Новгород;

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

– **Шахов А.Г.** – член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, ГНУ ВНИВФит Россельхозакадемии, г. Воронеж.

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. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Типография: ООО «Юнион Принт», 603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: (831) 439-44-99
Подписано в печать 00 июля 2015 года

СОДЕРЖАНИЕ

5 Чествование ветеранов войны и тружеников тыла в связи с 70-летием победы

НОВОСТИ

6 Об участии специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ» в международной выставке «VIV RUSSIA»

Об успешном прохождении тест-системы к метапневмовирусу птиц производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» комиссионных испытаний

7 Участие ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 9-й Азербайджанской международной выставке «Сельское хозяйство» — *Caspian Agro*

О прохождении процедуры подтверждения компетентности испытательной лаборатории ветпрепаратов ФГБУ «ВНИИЗЖ»

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

8 Д.А. Лозовой, В.А. Стариков, Д.В. Михалишин
Изучение протективной и антигенной активности вакцины из культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011

12 Д.С. Большаков, Т.Б. Никешина
Спектрофотометрические и энзиматические методы биохимического анализа сыворотки крови сельскохозяйственных животных

22 Н.Н. Луговская, Е.Н. Калинина, К.С. Малкова, О.В. Воробьева, Г.М. Горячева, Т.К. Майорова
Валидация методики определения уровня противоящурных антител в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа

30 А.В. Щербаков
Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура)

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

37 М.Р. Якупов, А.С. Яковлева, А.В. Щербаков
Использование рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L в серодиагностике африканской чумы свиней

БОЛЕЗНИ ПТИЦ

48 Али Шебли Дандал, В.В. Макаров
Тканевой тропизм и клиническое проявление инфекционного бронхита кур (обзор)

53 М.С. Волков, В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, А.С. Старова
Эпизоотологические аспекты стратегии профилактики и контроля гриппа птиц в России на современном этапе

59 Е.Ю. Ханюкова, М.А. Шустова, Н.Е. Камалова
Применение питательной среды Дульбекко DMEM/F12 HAM для культивирования вируса болезни Марек в культуре клеток фибробластов эмбрионов кур

62 М.С. Волков, А.В. Варкентин, В.Н. Ирза, А.С. Старова
Вспышка высокопатогенного гриппа птиц H5N1 на территории Алтайского края в 2014 г.: причины и опыт ликвидации

ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

66 Г.С. Скитович, Н.Б. Шадрова, О.В. Прунтова
Vibrio parahaemolyticus: распространение, выявление и методы идентификации

CONTENTS

CATTLE DISEASE

8 D.A. Lozovoy, V.A. Starikov, D.V. Mikhailishin
Study of protectivity and antigenicity of vaccine based on cultural Asia-1 No.2145/Tajikistan/2011 FMD Virus

12 D.S. Bolshakov, T.B. Nikeshina
Spectrophotometric and enzymatic methods for biochemical analysis of blood sera from farm animals

22 N.N. Lugovskaya, Ye.N. Kalinina, K.S. Malkova, O.V. Vorobyova, G.M. Goryacheva, T.K. Mayorova
Validation of the technique aimed at the determination of FMD antibodies in liquid phase blocking sandwich Elisa

30 A.V. Scherbakov
FMD molecular epizootology in Russia (phylogenetic analysis of Russian FMDV isolates)

SWINE DISEASE

43 M.R. Yakupov, A.S. Yakovleva, A.V. Scherbakov
Use of p30, pK205R and pB602L recombinant proteins for African swine fever serodiagnosis

AVIAN DISEASES

48 Ali Shebli Dandal, V.V. Makarov
Tissue tropism and clinical manifestation of chicken infectious bronchitis (review)

56 M.S. Volkov, V.N. Irza, A.V. Varkentin, A.S. Starova
Epizootological aspects of avian influenza prevention and control strategy in modern Russia

59 Ye.Yu. Khanyukova, M.A. Shustova, H.Ye. Kamalova
Use of Dulbecco's modified eagle's medium DMEM/F12 HAM for Marek's disease virus cultivation in chicken embryo fibroblasts

62 M.S. Volkov, A.V. Varkentin, V.N. Irza, A.S. Starova
H5N1 highly pathogenic influenza in Altaysky krai in 2014: causes and eradication

FOOD SAFETY

66 G.S. Skitovich, N.B. Shadrova, O.V. Pruntova
Vibrio parahaemolyticus: spread, detection and identification techniques

ЧЕСТВОВАНИЕ ВETERАНОВ ВОЙНЫ И ТРУЖЕНИКОВ ТЫЛА В СВЯЗИ С 70-ЛЕТИЕМ ПОБЕДЫ

7 мая 2015 года состоялось заседание ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», на которое были приглашены бывшие сотрудники ВНИИИ–ФГБУ «ВНИИЗЖ», участники Великой Отечественной войны и труженики тыла, которых, к сожалению, становится все меньше. На заседании ученого совета выступил временно исполняющий обязанности директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» Д.А. Лозовой, который поздравил коллектив учреждения с 70-летием Победы в Великой Отечественной войне. Он рассказал о боевых подвигах и трудовых делах участников войны и тружеников тыла во время войны и о последующей работе в нашем институте (подробная информация об этом помещена в журнале «Ветеринария сегодня», №2 (13), 2015 г.).

Приглашенные ветераны поделились своими воспоминаниями о прошедшем времени, которые с интересом были выслушаны сотрудниками института, работающими в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в настоящее время. Группа ветеринарных специалистов — бывших научных сотрудников (А.Н. Бурдов, Т.Е. Калугина, С.В. Денисова, В.М. Гневашев, А.С. Назаров) были отмечены памятной медалью ФГБУ «ВНИИЗЖ» «За вклад в ветеринарную науку».

Приглашенным ветеранам вручили цветы и сувениры. Они выразили благодарность дирекции и профсоюзной организации ФГБУ «ВНИИЗЖ» за оказанное внимание и поддержку.



ОБ УЧАСТИИ СПЕЦИАЛИСТОВ ФГБУ «ВНИИЗЖ» В МЕЖДУНАРОДНОЙ ВЫСТАВКЕ «VIV RUSSIA»

Сотрудники подведомственного Россельхознадзора ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» приняли участие в международной выставке инновационных технологий для мясного и молочного животноводства, свиноводства и птицеводства «VIV Russia», которая прошла в Москве в международном выставочном центре «Крокус Экспо».

«VIV Russia» — это важная отраслевая площадка для демонстрации самых передовых разработок для производства продукции: от оборудования и технологий

для выращивания и содержания сельскохозяйственных животных до кормопроизводства и переработки сырья. Идеальное место встречи для профессионалов агропромышленного комплекса со всего мира.

Участники представили сельскохозяйственную технику, оборудование, запасные части, технологии орошения и удобрения, средства защиты растений, семена и саженцы, продукты животного происхождения, аксессуары и компоненты, ветеринарные препараты, корма для скота и прочие достижения агропромышленного комплекса.

Поскольку одной из сфер деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» является производство высокоэффективных экологически безопасных лечебно-профилактических и диагностических биопрепаратов ветеринарного назначения, направленность выставки полностью совпала с интересами учреждения. Центр представил свои научные разработки, новые технологии и передовые достижения в области ветеринарной науки.

Особая заинтересованность в продукции Центра проявлена предприятиями — производителями животноводческой и птицеводческой продукции из Египта, Ирака, Саудовской Аравии и других стран.



ОБ УСПЕШНОМ ПРОХОЖДЕНИИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ К МЕТАПНЕВМОВИРУСУ ПТИЦ ПРОИЗВОДСТВА ФГБУ «ВНИИЗЖ» КОМИССИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ

На базе подведомственного Россельхознадзора ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» завершены комиссионные испытания «Набора для определения антител к метапневмовирусу птиц иммуноферментным методом (ИФА) при тестировании сывороток в одном разведении». По результатам испытаний комиссией установлено соответствие тест-системы всем показателям качества и безопасности, предъявляемым современными стандартами к диагностикумам. Набор позволяет одновременно выявлять и оценивать уровни гуморальных антител к подтипам А и В метапневмовируса, по чувствительности и специфичности не уступает импортным аналогам, что позволяет рекомендовать его для применения в птицеводстве.

Существующие тест-системы для выявления антител к метапневмовирусу методом ИФА могут значительно отличаться по целому ряду параметров, что в первую очередь зависит от свойств производственного штамма вируса, используемого для получения антигена. Импортные аналоги, представленные на российском рынке, как правило, изготовлены из штаммов, выделенных на территории стран дальнего зарубежья, или «музейных» штаммов и не учитывают специфики регионов, что снижает эффективность их использования.

«Набор для определения антител к метапневмовирусу птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» был разработан сотрудниками референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» с учетом эпизоотической ситуации на территории России и стран ближнего зарубежья. На протяжении ряда лет в лаборатории проводились мониторинговые исследования, были выбраны отечественные кандидатные штаммы метапневмовирусов птиц наиболее распространенных подтипов А и В, комплексно оценены их иммунобиологические свойства. Вирусы были депонированы в коллекцию штаммов ФГБУ «ВНИИЗЖ» и использованы для разработки диагностического набора.

Такой комплексный подход к разработке тест-систем могут осуществлять только крупнейшие научные центры, в полной мере владеющие данными о текущей ситуации в регионе и биологических свойствах полевых изолятов, обладающие мощной производственной базой, способные прогнозировать развитие эпизоотической ситуации и оценивать риски заноса и распространения инфекционных болезней птиц, незамедлительно реагировать на новые угрозы.

УЧАСТИЕ ФГБУ «ВНИИЗЖ» В 9-Й АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ ВЫСТАВКЕ «СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО» — CASPIANAGRO

Коллектив сотрудников подведомственного Россельхознадзора ФГБУ «ВНИИЗЖ» участвовал в работе 9-й Азербайджанской международной выставки «Сельское хозяйство» — CaspianAgro, которая прошла в Экспо-Центре в Баку.

За годы работы выставка зарекомендовала себя как надежный фундамент для ежегодных встреч специалистов, демонстрации техники и оборудования, товаров и услуг для сельскохозяйственной отрасли. Важным событием в истории выставки стало то, что CaspianAgro 2015 включена в план мероприятий, приуроченных к Году сельского хозяйства, утвержденному президентом Азербайджана Ильхамом Алиевым. Это положительно отразилось на выставке и привлекло к ней еще большее внимание.

Участники представили оборудование для содержания и кормления животных и птицы, для последующей переработки сельскохозяйственной продукции, современную технику для производства и хранения кормов, образцы техники для поддержания микроклимата, производства энергии и защиты окружающей среды, а также ветеринарные препараты, проекты по строительству помещений для содержания животных и птицы, племенные программы, методики для воспроизводства стада и многое другое.

Аграрные реформы, проведенные в Азербайджане, способствовали динамичному развитию сельского хозяйства, что вызвало 20% рост по сравнению с прошлым годом и соответственно увеличение спроса на биопрепараты для животных. ФГБУ «ВНИИЗЖ» имеет уникальную и единственную в России опытно-экспериментальную базу для проведения специальных работ с возбудителями особо опасных и экзотических болезней животных, соответствующую международным стандартам биологической безопасности BSL-3. Поэтому высокоэффективные, более доступные по стоимости по сравнению с аналогами, экологически безопасные лечебно-профилактические и диагности-

ческие биопрепараты для животных производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» вызвали большой интерес у посетителей выставки.

Особую заинтересованность в продукции Центра проявили представители Управления ветеринарии Азербайджана, Научно-контрольного института ветеринарных препаратов, ветеринарного управления по контролю ветеринарных препаратов, муниципального управления города Шамкира. Также стенд ФГБУ «ВНИИЗЖ» привлек сотрудников посольства Российской Федерации в Азербайджане, предпринимателей и фермеров из регионов Барда, Гянджа, Джалилабад, Исмаиллы, Шеки, Физули, Хачмас, Уджар и др., представителей торговых домов России (Москва, Санкт-Петербург), делегацию из немецко-украинской научно-производственной фирмы «Бровафарма». Научными и биопрепаратами Центра заинтересовались представители правительства штата Виктория (Австралия), сотрудники инвестиционных компаний Bank Standart, NovaNord и многие другие.

Деловые контакты, полученные на выставке, встречи с государственными организациями Азербайджана будут способствовать укреплению конкурентоспособности продукции Центра и развитию новых направлений научного сотрудничества.



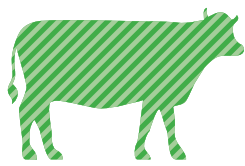
О ПРОХОЖДЕНИИ ПРОЦЕДУРЫ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОМПЕТЕНТНОСТИ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ВЕТПРЕПАРАТОВ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Согласно приказу Федеральной службы по аккредитации «О проведении процедуры подтверждения компетентности испытательной лаборатории ветпрепаратов (ИЛ) подведомственного Россельхознадзора Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» от 05 мая 2015 г. № 5135 с 1 по 3 июля 2015 г. испытательная лаборатория (ИЛ) прошла процедуру подтверждения компетентности экспертной группой по аккредитации ООО «Национальный центр по сертификации».

Экспертной группой проведена экспертиза документов и компетентности ИЛ на соответствие кри-

териям аккредитации испытательных лабораторий (центров), установленных в приложении к приказу Минэкономразвития России от 30.05.2014 г. № 326 «Об утверждении критериев аккредитации, перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации, и перечня документов в области стандартизации, соблюдение требований которых заявителями, аккредитованными лицами обеспечивает их соответствие критериям аккредитации».

По результатам проведенной экспертизы ИЛ ФГБУ «ВНИИЗЖ» соответствует критериям аккредитации и требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009.



УДК 619:616.98:578.835.2:615.371

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ И АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ВИРУСА ЯЩУРА АЗИЯ-1 №2145/ТАДЖИКИСТАН/2011

Д.А. Лозовой¹, В.А. Стариков², Д.В. Михалишин³

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

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

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

РЕЗЮМЕ

В данной статье представлены результаты исследований протективных антигенных отличий изолята Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 от вакцинного штамма культурального вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89.

Ключевые слова: антитела, вакцина, вирус ящура, штамм, реакция нейтрализации.

UDC 619:616.98:578.835.2:615.371

STUDY OF PROTECTIVITY AND ANTIGENICITY OF VACCINE BASED ON CULTURAL ASIA-1 NO.2145/ TAJIKISTAN/2011 FMD VIRUS

D.A. Lozovoy¹, V.A. Starikov², D.V. Mikhailishin³

¹ Interim Director, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine) FGBI ARRIAH, Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI ARRIAH, Vladimir, e-mail: starikov@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI ARRIAH, Vladimir, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents the results of tests aimed to study the protective antigen differences between Asia-1 No. 2145/Tajikistan/2011 isolate and Asia-1 Shamir 3/89 FMD cultural virus vaccine strain.

Key words: antibodies, vaccine, foot-and-mouth virus, strain, neutralization test.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ материалов Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) свидетельствует о том, что эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в последние годы остается довольно напряженной. Особую значимость имеет неблагоприятная ситуация в государствах, которые граничат со странами СНГ или расположены вблизи них, а также в государствах, с которыми имеются тесные хозяйственно-экономические, социально-культурные, туристические связи. Ящур типа Азия-1 получил большее распространение в мире с 1999 г. В Китае вспышки ящура типа Азия-1, начавшиеся в 2005 г., несмотря на уничтожение всех животных в ящурных очагах, возникали и в течение 2006–2009 гг. [4]. По данным многих исследователей, ряд последних вспышек ящура типов А, О, Азия-1 был обусловлен антигенно-измененными штаммами вируса [3]. В мае–июне 2011 г. ящур типа О зарегистрирован в Западно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях Казахстана, типов О и А — в Киргизии, в июле–августе — тип О в Южной Осетии. В мае 2011 г. в Республике Таджикистан была зарегистрирована вспышка ящура типа Азия-1 [2].

Сложившаяся ситуация диктует необходимость совершенствования эффективности мер по профилактике и борьбе с ящуром [5].

Эффективность вакцинации животных и напряженность противоящурного иммунитета в первую очередь зависят от соответствия вакцинного штамма эпизоотическому изоляту вируса. С увеличением количества иммуногенных компонентов в прививной дозе вакцины защита животных от заражения гетерологичным штаммом вируса ящура возрастает. Высокоиммуногенные вакцины индуцируют раннюю защиту против гетерологичного вируса ящура [6, 7].

Задачей данной работы было изучение антигенного соответствия вновь выделенного изолята и вакцинного штамма вируса ящура Азия-1.

Цель исследований — изготовление вакцины на основе штамма Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 и изучение ее иммунобиологической активности на крупном рогатом скоте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В опыте использовали крупный рогатый скот (КРС) массой 250–300 кг в количестве 20 гол.

Вирусный материал. В работе использовали вирус ящура штамма Азия-1 №2145/Таджикистан/2011, Азия-1 Шамир 3/89.

Культура клеток. Использовали первично трипсинизированную культуру клеток почки свиньи (СП); перевиваемые линии клеток ВНК-21-2/17.

Растворы и реактивы: 15–20% раствор аминоксил-этиленимина (АЭЭИ); полисепт (полигексаметиленгуанидин) производства ОАО «ПЗБ», г. Покров.

Адьюванты: масляные адьюванты Montanide ISA 70, ISA 206 (SEPPIC, Франция).

Питательные среды: Игла, 0,4% гидролизат лактальбумина (ГЛА) на растворе Эрла.

Вакцины:

№ 1 — эмульсионная вакцина из культурального вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89 с адьювантом Montanide ISA 206. Прививная доза 2 см³ содержала 4,4 мкг иммуногенных компонентов;

№ 2 — эмульсионная вакцина из культурального вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89 с адьювантом

Montanide ISA 70. Прививной объем 2 см³ включал 4,4 мкг иммуногенных компонентов.

№ 3 — эмульсионная вакцина из культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 с адьювантом Montanide ISA 206, содержала 7,0 мкг иммуногенных компонентов в прививной дозе 2 см³.

Методы. Для изготовления вакцин использовали культуральный вирус ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 и Азия-1 Шамир 3/89, репродуцированный в суспензионной культуре клеток ВНК-21-2/17.

Инактивацию инфекционности вируса проводили 0,05% АЭЭИ в течение 12 ч при температуре 37 °С.

Очистку суспензии инактивированного вируса осуществляли с помощью полигексаметиленгуанидина в концентрации 0,007% и последующей декантации суспензии с образовавшегося осадка.

Авирулентность суспензии инактивированного вируса контролировали с помощью монослойной культуры клеток СП.

Антиген концентрировали методом ультрафильтрации.

Эмульсионную вакцину на основе масляного адьюванта Montanide ISA 70 готовили в пропорции 60:40.

Эмульсионную вакцину на основе масляного адьюванта Montanide ISA 206 готовили в соотношении 50:50 к водной фазе антигена.

Вакцины вводили бычкам подкожно в среднюю треть шеи.

Ревакцинацию проводили на 10 сут. после первичной иммунизации животных.

Пробы крови отбирали на 10, 21 и 24 сут. после вакцинации.

Антигенную активность вакцин оценивали в реакции нейтрализации на монослое клеток СП по общепринятой методике.

Протективную активность вакцин определяли методом прямого заражения животных суспензией афтозного вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89 и Азия-1 №2145/Таджикистан/2011. Суспензию афтозного вируса вводили КРС интрадермоинъекционно в дозе 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³.

Результаты контрольного заражения учитывали на 7 сут. после инфицирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения антигенных свойств вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011, проведенные в реакции микронейтрализации (r₁=0,21) и методом иммуноферментного анализа (r₁=0,13±0,01), указывали на его значительное отличие от производственного штамма Азия-1 Шамир 3/89 [1].

Первым этапом исследований было определение уровня гуморального иммунитета у КРС, привитого эмульсионными вакцинами из культурального вируса ящура против гомологичного и гетерологичного вируса ящура.

В табл. 1 показаны результаты изучения антигенной активности вакцин, изготовленных на основе вируса Азия-1 Шамир 3/89.

Все 10 вакцинированных бычков были защищены от генерализованной формы против гомологичного вируса ящура типа Азия-1 Шамир.

Представленные данные позволили рассчитать разницу в титрах вируснейтрализующих антител (ВНА) против гомологичного и гетерологичного вируса ящура, которая составила 0,95–1,05 log₂ и является статистически значимой.

Таблица 1
Антигенная активность эмульсионных вакцин из культурального вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89

Характеристика вакцины	№ животных	Наличие генерализации против вируса ящура Азия-1 Шамир	Титр антител на 21 сут. после вакцинации, log ₂	
			Азия-1 Шамир 3/89	Азия-1 №2145/Таджикистан/2011
Вакцина №1 АГ — 4,4 мкг ISA 206	1	-	6,00	4,50
	2	-	5,25	3,50
	3	-	5,50	5,00
	4	-	6,00	4,75
	5	-	5,00	4,75
	M±m		5,55±0,20	4,50±0,26
Вакцина №2 АГ — 4,4 мкг ISA 70	1	-	5,50	5,50
	2	-	6,25	5,00
	3	-	5,25	4,00
	4	-	5,25	3,75
	5	-	5,75	5,00
	M±m		5,60±0,19	4,65±0,33
Контроль вируса		+		

В следующем опыте было изучено влияние ревакцинации вакцины №1 на формирование иммунитета у КРС. Для этого 3 головы КРС иммунизировали вакциной №1 и через 10 сут. провели ревакцинацию. Титры ВНА определяли у привитых животных на 10 и 21 сут. после вакцинации. Через 21 сут. провели контрольное заражение гетерологичным вирусом Азия-1 №2145/Таджикистан/2011.

В табл. 2 отражены результаты ревакцинации животных вакциной №1.

Анализируя полученные результаты, можно сделать заключение о том, что ревакцинация позволила увеличить титры ВНА против гомологичного штамма Азия-1 №2145/Таджикистан/2011, в сравнении с однократной иммунизацией. Заражение гетерологичным вирусом Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 через 21 сут. не вызвало генерализованного процесса заболевания у 3 повторно иммунизированных животных.

Следующую группу КРС иммунизировали вакциной из культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011. В табл. 3 представлены результаты контроля иммунитета у животных через 24 сут. после вакцинации.

Титр антител у животных против гетерологичного вируса Азия-1 Шамир 3/89 был в 7 раз ниже по сравнению с титром антител против гомологичного вируса Азия-1 №2145/Таджикистан/2011.

Разница в титрах ВНА составила 2,8 log₂, что указывает на достоверность различий гетерологичности штаммов.

Генерализованной формой ящура не заболел ни один из 4 вакцинированных бычков, а первичные афты были только у 2 вакцинированных животных.

На основании проведенных исследований можно предположить, что 2-кратная иммунизация КРС вакциной из культурального вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89 предотвратит развитие генерализованной

Таблица 2
Влияние ревакцинации на формирование иммунитета у КРС

Характеристика вакцины	№ животных	Наличие генерализации против вируса ящура Азия-1 Таджикистан	Титр антител против культурального вируса ящура, log ₂			
			Азия-1 Шамир 3/89		Азия-1 №2145/Таджикистан/2011	
			10 сут.	21 сут.	10 сут.	21 сут.
Вакцина №1 АГ — 4,4 мкг ISA 206	1	-	4,50	7,00	3,25	5,75
	2	-	4,75	7,75	3,50	6,00
	3	-	4,25	6,75	3,00	5,50
	M±m		4,50±0,14	7,17±0,30	3,25±0,14	5,75±0,14
Контроль вируса		+				

Таблица 3
Эффективность вакцины из культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 для КРС против вируса Азия-1 Шамир 3/89

Характеристика вакцины	№ животных	Наличие генерализации против вируса ящура Азия-1 Шамир	Титр антител на 24 сут. после вакцинации, log ₂	
			Азия-1 №2145/Таджикистан	Азия-1 Шамир 3/89
Вакцина №3 АГ — 7,0 мкг ISA 206	1	-	6,25	3,50
	2	-	6,75	3,25
	3	-	7,25	5,25
	4	-	5,50	2,25
	M±m		6,44±0,37	3,62±0,58
Контроль вируса		+		

формы ящура при возникновении очага вируса (при возможном заносе вируса) ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штамм культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 по антигенным свойствам существенно отличается от вакцинного штамма Азия-1 Шамир 3/89. Однако эмульсионная вакцина, содержащая в прививной дозе 4,4 мкг иммуногенных компонентов, при ревакцинации через 10 сут. защитила КРС от заражения гетерологичным вирусом ящура. Двукратная иммунизация увеличила напряженность иммунитета.

Эмульсионная вакцина из культурального вируса ящура Азия-1 №2145/Таджикистан/2011 защитила всех 4 животных при однократной иммунизации против гетерологичного вируса ящура Азия-1 Шамир 3/89.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Результаты изучения антигенного соответствия изолятов вируса ящура типа Азия-1 производственному штамму Азия-1/Шамир 3/89 / С.Р. Кременчугская, Т.К. Майорова, Н.Е. Камалова, Д.Н. Афонина // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2012. — Т. 10. — С. 19–25.

2. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2011 году / А.М. Рахманов, С.Р. Кременчугская, А.В. Мищенко, А.В. Щербаков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2012. — Т. 10. — С. 7–18.

3. Antigenic variation of foot-and-mouth disease virus serotype A / A.B. Ludi, D.L. Horton, Y. Li [et al.] // J. Gen. Virol. — 2014. — Vol. 95. — P. 384–392.

4. FAO/EuFMD. Foot-and-Mouth Disease situation. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Monthly Report, August 2013. — 21 p.

5. Foot and mouth disease // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — Vol. 1, Chapter 2.1.5. — P. 145–173.

6. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus / K.E. Brehm, N. Kumar, H.H. Thulke, B. Haas // Vaccine. — 2008. — Vol. 26. — P. 1681–1687.

7. Protection to homologous and heterologous challenge in pigs immunized with vaccine against foot-and-mouth disease type O caused an epidemic in East Asia during 2010/2011 / J.-N. Park, S.-Y. Lee, J.-Q. Chi [et al.] // Vaccine. — 2014. — Vol. 32. — P. 1882–1889.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Д.С. Большаков¹, Т.Б. Никешина²

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

² заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе описаны традиционные и современные принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови животных: общего белка, альбумина, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, билирубина (общего и прямого), глюкозы, молочной кислоты, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов, кальция, магния, фосфора, калия, натрия, железа, хлоридов, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, α -амилазы, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, холинэстеразы, γ -глутамилтранспептидазы и гемоглобина.

Ключевые слова: биохимический анализ, биохимические показатели, сыворотка крови сельскохозяйственных животных.

SPECTROPHOTOMETRIC AND ENZYMATIC METHODS FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS OF BLOOD SERA FROM FARM ANIMALS

D.S. Bolshakov¹, T.B. Nikeshina²

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

² head of laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

Conventional and present-day principles of spectrophotometric and enzymatic determination of major biochemical values of animal blood serum (plasma) are described in the paper: total protein, albumin, urea, uric acid, creatinine, bilirubin (total and conjugated bilirubin), glucose, lactic acid, triglycerides, cholesterol, phospholipids, calcium, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, ferrum, chlorides, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, creatine kinase, α -amylase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholinesterase, γ -glutamyltransferase and hemoglobin.

Key words: biochemical analysis, biochemical values, blood sera from farm animals.

ВВЕДЕНИЕ

Успехи в животноводстве в значительной степени зависят от четкой работы ветеринарной службы. В связи с этим следует уделять большое внимание своевременному и качественному выполнению ветеринарных мероприятий, направленных на ликвидацию различных болезней сельскохозяйственных животных, регулярно осуществлять научно обоснованную и специфическую профилактику. Именно проведение биохимического анализа сыворотки крови и биологических жидкостей позволяет проводить своевременную диагностику (при отсутствии клинического проявления) болезней. Кроме того, биохимические исследования дают возможность контролировать и полноценность используемых кормов.

При проведении биохимических исследований используют рефрактометрические, флуориметрические, поляриметрические, нефелометрические, турбидиметрические, электрофоретические, хроматографические методы, а также методы пламенной фотометрии и атомно-абсорбционной спектроскопии для определения элементного состава. Среди всех методов следует выделить группу спектрофотометрических и энзиматических (ферментных) методов, которые по избирательности и чувствительности не уступают хроматографическим методам (ВЭЖХ, ТСХ), а по доступности и простоте выполнения измерений существенно превосходят их.

Цель данной работы заключалась в рассмотрении существующих принципов спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей проб биоматериалов.

ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Общий белок. Белки относятся к высокомолекулярным соединениям; в их состав входит более 20 видов α -L-аминокислот, соединенных между собой пептидной связью (-CO-NH-). Различают простые и сложные белки. Простые белки состоят только из аминокислот, в сложные входят и другие вещества: в липопротеиды — липиды, в гликопротеиды — углеводы, в нуклеопротеиды — нуклеиновые основания.

Колориметрическая реакция между молекулами белка и ионами меди, так называемая биуретовая реакция, известна с 1848 г. [6]. В 1914 г. была опубликована работа Regler и соавт., и с этого времени основное внимание было уделено стабилизации ионов меди в щелочном реагенте. В 1939 г. Kingsley и соавт. модифицировали процедуру, а в 1942 г. предложили использовать в качестве комплексона тартрат натрия или калия. Впоследствии эта процедура была модифицирована Weichselbaum и соавт., Gornall и соавт. Принцип метода заключается в том, что белок сыворотки в щелочной среде при взаимодействии с ионами меди образует фиолетовый комплекс [3, 5–8] (таблица). Абсорбция образовавшегося комплекса прямо пропорциональна концентрации белка в исследуемом образце.

Альбумин — простой белок, синтезирующийся в печени; в плазме крови поддерживает коллоидно-осмотическое давление, играет важную роль в транспорте многих веществ экзогенного и эндогенного происхождения.

Для определения сывороточного альбумина методы фракционного высаливания были слишком трудоемки и заменены методами с применением азокрасителей. Использование реакции с бромкрезоловым зеленым

[6–8, 10] стало предпочтительным методом из-за высокой специфичности к альбумину и незначительному влиянию на данную реакцию гемолиза, билирубина и салицилатов. Суть метода заключается в избирательном взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым при pH 4,2 (таблица). Увеличение поглощения образующегося комплекса альбумин—краситель при 630 нм прямо пропорционально концентрации альбумина.

Менее специфичными являются методы определения альбумина с бромкрезоловым красным, метиловым оранжевым и натриевой солью 2-(4-оксиазобензол)-бензойной кислоты [6].

ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Мочевина — осмотически активное вещество, играющее важную роль в механизмах концентрирования мочи. Синтез мочевины происходит в печени главным образом из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Мочевину определяют прямым методом, в котором при взаимодействии с диацетиллом (или диацетилмонооксимом) образуется хромоген [3, 5–7, 9], и непрямой методом, в котором измеряют концентрацию аммиака как продукта воздействия уреазы на мочевину. Выделенный аммиак можно измерить фотометрически с использованием реактива Несслера и по реакции Berthelot с гипохлоритом и фенолом [3]. В 1965 г. Talke и Shubert ввели общую энзиматическую процедуру с использованием уреазы и глутаматдегидрогеназы [8]: мочевина гидролизует уреазой, при этом образуется аммиак и углекислый газ. Выделенный аммиак в присутствии NADH¹ взаимодействует с α -кетоглутаратом с образованием глутамата. В результате реакции NADH подвергается окислению, что сопровождается уменьшением абсорбции (оптический тест Варбурга [6]), интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации мочевины в исследуемом образце (табл.).

Мочевая кислота является конечным продуктом распада пуриновых оснований. Образовавшаяся мочевая кислота выделяется почками.

Для определения мочевой кислоты в сыворотке крови используются спектрофотометрические [3, 6–8, 10], энзиматические [8] и другие методы. Наиболее специфические и точные — ферментативные (уреазные) методы. В основе определения лежит реакция окисления мочевой кислоты уриказой до аллантаина и перекиси водорода [8]. В присутствии пероксидазы перекись водорода инициирует присоединение 4-аминоантипирина к дихлор-2-гидроксibenзолсульфонату натрия (ДХГБС) с образованием хромогена, абсорбция которого измеряется при 520 нм (таблица). Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна количеству перекиси водорода, образуемому из мочевой кислоты.

Необходимо отметить, что первый метод определения мочевой кислоты был предложен Folin O., Denis W. в 1912 г. Он основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовую кислоту

¹ NAD (НАД) — никотинамидениндинуклеотид (существует в двух формах: окисленной (NAD⁺) и восстановленной (NADH)).

с образованием окрашенного соединения. Впоследствии метод подвергался многочисленным модификациям и до настоящего времени остается одним из наиболее распространенных [3, 6, 7, 9].

Креатинин — конечный продукт креатин-фосфатной реакции: креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, из которого образуется

креатинин (ангидрид креатина). Креатинин участвует в энергетическом обмене мышечной и других тканей. Из организма выводится почками с мочой, поэтому креатинин (его количество в крови) — важный показатель функционирования почек.

Измерение содержания креатинина в сыворотке крови основано на реакции его взаимодействия с пи-

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Общий белок	Белок + Cu ²⁺ [pH>7,0] → Окрашенный комплекс	540	Концентрация общего белка в сыворотке крови стабильна в течение недели при комнатной температуре 15–30 °С, один месяц в холодильнике при 2–8 °С
Альбумин	Альбумин + Бромкрезоловый зеленый [pH 4,2] → Комплекс Альбумин—Краситель	630	Альбумин в сыворотке стабилен в течение одной недели при комнатной температуре (15–30 °С) и приблизительно одного месяца при хранении в холодильнике (2–8 °С)
Мочевина	1) Мочевина + H ₂ O [Уреаза] → 2NH ₃ + CO ₂ ; 2) NH ₃ + α-Кетоглутарат + NADH + H ⁺ → L-глутамат + NAD + H ₂ O	340	Сыворотка сразу же должна быть отделена от кровяного сгустка, так как скорость снижения содержания глюкозы в цельной крови приблизительно 7% в час. Концентрация мочевины в сыворотке крови стабильна в течение 72 ч в холодильнике при 2–8 °С
Глюкоза	1) β-D-Глюкоза + H ₂ O + O ₂ [Глюкозооксидаза] → H ₂ O ₂ + D-Глюконовая кислота; 2) H ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + Фенол (Пероксидаза) → Хинониминный краситель + H ₂ O	500–520	Глюкоза в сыворотке стабильна в течение 24 ч при 2–8 °С
Молочная кислота	1) Лактат + O ₂ + H ₂ O [Лактатоксидаза] → Пируват + H ₂ O ₂ ; 2) 2H ₂ O ₂ + 4-аминоантипирин + TOOS [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + H ₂ O	550	Для анализа лучше всего использовать плазму крови с оксалатом калия или натрия в качестве антикоагулянтов. Образцы плазмы можно хранить в течение двух дней в холодильнике при 2–8 °С и 1 месяц при –20 °С
ЩФ	p-Нитрофенилфосфат + H ₂ O [ЩФ] → p-Нитрофенол + H ₃ PO ₄	405	Образцы должны храниться в холоде, их необходимо анализировать сразу после сбора биоматериала, т.к. уровень ЩФ в сыворотке значительно увеличивается со временем в процессе хранения при 2–8 °С или при комнатной температуре. Может использоваться гепаринизированная плазма ³
Холестерин	1) Эфир холестерина [Холинэстераза] → Холестерин + Жирные кислоты; 2) Холестерин + O ₂ [Холестерин оксидаза] → Холестерин-3-он + H ₂ O ₂ ; 3) H ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + p-ГБС [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + 2H ₂ O	520	Холестерин в сыворотке стабилен в течение 7 дней при комнатной температуре (18–25 °С) и в течение 6 месяцев в замороженном виде и в условиях, препятствующих испарению ³
Кальций	Ca ²⁺ + Арсенazo III → Комплекс Ca ²⁺ —Арсенazo III (сине-фиолетовая окраска становится розовой)	670	Свежую плазму следует исследовать сразу. Образцы сыворотки стабильны как минимум 7 дней при температуре 20–25 °С, 3 недели — при температуре 4–8 °С или 8 месяцев при –20 °С

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных (Продолжение)

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Триглицериды	1) Триглицериды [Липаза] → Глицерин + Жирные кислоты; 2) Глицерин + АТФ [Глицерин киназа] → Глицерин-1-фосфат + ADP; 3) Глицерин-1-фосфат + O ₂ [Глицерин фосфат оксидаза] → DAP + H ₂ O ₂ ; 4) H ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + p-ГБС [Пероксидаза] → Хинониминный краситель + 2 H ₂ O	520	Триглицериды в сыворотке стабильны в течение 3 дней при 2–8 °С. Не рекомендуется длительное хранение образцов при комнатной температуре, так как могут подвергнуться гидролизу с высвобождением глицерина другие соединения
ФЛ	1) Фосфолипиды + H ₂ O [Фосфолипаза] → Холин + Фосфорная кислота; 2) Холин + 2O ₂ + H ₂ O [Холинэстераза] → Бетаин + 2H ₂ O ₂ ; 3) 2H ₂ O ₂ + 4-аминофеназон + дихлорфенол [Пероксидаза] → Кинонимин + 4H ₂ O	505	ФЛ стабильны в сыворотке или в плазме крови в течение 1 дня при комнатной температуре и 1 неделю при хранении в холодильнике (2–8 °С)
ЛДГ	L-Лактат + NAD [ЛДГ] → Пируват + NADH + H ⁺	340	ЛДГ в сыворотке стабильна в течение 2–3 дней при комнатной температуре. ЛДГ печени очень нестабильна и может разрушаться при замораживании–оттаивании сыворотки ³
КК	1) Креатинфосфат + АДФ [КК] → Креатин + АДФ; 2) АДФ + D-глюкоза [Гексокиназа] → Глюкозо-6-фосфат + АДФ; 3) Глюкозо-6-фосфат + NAD [Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа] → 6-Фосфоглюконат + NADH + H ⁺ ;	340	Сыворотка стабильна в течение 4 ч при комнатной температуре, 8–12 ч при 4 °С и 2–3 дня при заморозке
Гемоглобин ⁴	1) ГГ + K ₂ [Fe(CN) ₆] → Метгемоглобин; 2) Метгемоглобин + KCN → Цианметгемоглобин;	540	Цельная кровь с антикоагулянт (ЭДТА, оксалатами, цитратами или гепарином) стабильна в течение одной недели при комнатной температуре 15–30 °С
АЛТ	1) L-Аланин + α-Кетоглутарат [АЛТ] → Пируват + L-глутамат; 2) Пируват + NADH + H ⁺ [ЛДГ] → L-Лактат + NAD ⁺ + H ₂ O	340	Концентрация фермента стабильна в течение 3 дней при комнатной температуре (15–30 °С), 7 дней в холодильнике при 2–8 °С и 30 суток в холодильнике при +20 °С
АСТ	1) L-Аспарат + 2-Оксоглутарат [АСТ] → Оксалоацетат + L-Глутамат; 2) Оксалоацетат + NADH + H ⁺ [МДГ] → Лактат + NAD ⁺ + H ₂ O;	340	Хранить сыворотку в пробирке с плотно закрытой крышкой. Фермент в сыворотке стабилен как минимум в течение 7 дней при 2–8 °С. Можно использовать плазму, обработанную ЭДТА или гепарином
Холинэстераза	1) Бутирилтиохолин + H ₂ O [Холинэстераза] → Тиохолин + Бутират; 2) Тиохолин + 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойная кислота) → 2-нитро-5-меркаптобензоат	405	Активность холинэстеразы заметно не изменяется при хранении сыворотки в герметически закрытых пробирках в холодильнике при температуре 2–6 °С в течение 4 дней
ГГТ	L-γ-глутамил-p-нитроанилид + Глицилглицин [ГГТ] → L-γ-глутамил-глицилглицид + p-Нитроанилид	405	Активность ГГТ не изменяется в течение 7 дней при хранении сыворотки при 4 °С и в течение 3 месяцев при –20 °С
Хлориды	1) Hg(SCN) ₂ + 2Cl ⁻ → HgCl ₂ + 2(SCN) ⁻ ; 2) 3(SCN) ⁻ + Fe ³⁺ → Fe(SCN) ₃ (красное окрашивание)	480	Хранить образцы сыворотки крови в пробирке с плотно закрытой крышкой. Концентрация хлоридов в сыворотке стабильна в течение одного дня при комнатной температуре (18–25 °С) и три месяца в холодильнике при –20 °С

Таблица
Принципы спектрофотометрического и энзиматического определения
основных биохимических показателей сыворотки (плазмы) крови сельскохозяйственных животных
(Окончание)

Показатель	Принцип метода ¹	Длина волны УФ-излучения, нм	Хранение и стабильность образцов ²
1	2	3	4
Натрий	o-Нитрофенил-β-D-гликозида [Na ⁺ , β-галактозидаза] → o-Нитрофенол + Галактоза	405	-
Билирубин	Билирубин (общий) + Сульфаниловая кислота + NaNO ₂ [ДМСО] → Азобилирубин; Билирубин (прямой) + Сульфаниловая кислота + NaNO ₂ [H ₂ O] → Азобилирубин;	560	Все образцы должны быть тщательно защищены от света. Билирубин в сыворотке стабилен в течение 4–7 дней при хранении в холодильнике (2–8 °С) и в темноте
Креатинин	Креатинин + Пикрат натрия [Щелочная среда] → Комплекс Креатинин-Пикрат (желто-оранжевый)	510	Креатинин в сыворотке крови стабилен в течение 24 ч при хранении в холодильнике (2–8 °С) и в течение нескольких месяцев в замороженном виде (–20 °С) и в условиях, защищенных от испарения и загрязнения
Мочевая кислота	1) Мочевая кислота + O ₂ + 2H ₂ O [Уриказа] → Аллантин + CO ₂ + H ₂ O ₂ ; 2) 2H ₂ O ₂ + 4-Аминоантипирин + ДХГБС [Пероксидаза] → Хромоген + 4H ₂ O	520	Концентрация мочевой кислоты в сыворотке стабильна в течение трех дней в холодильнике при 2–8 °С и шесть месяцев при –20 °С
Железо	1) Железо(Fe ³⁺)-Железосвязывающий белок [Кислотный буферный раствор] → Fe ³⁺ + Трансферрин; 2) Fe ³⁺ + Гидроксиламин + Тиогликолят → Fe ²⁺ ; 3) Fe ²⁺ + Феррозин → Fe ²⁺ -Феррозин (пурпурно-красный конъюгат)	560	Отделенную от кровяного сгустка сыворотку хранить при комнатной температуре не более 8 ч; при 2–8 °С не более 48 ч
Магний	Магний + Кальмагит → Окрашенный комплекс	530	Использовать свежие негемолизированные образцы сыворотки крови
Калий	K ⁺ + Тетрафенилборат натрия → Коллоидная взвесь	500	Для предотвращения малейшей утечки калия из внутриклеточной во внеклеточную жидкость отделить эритроциты следует как можно скорее
α-Амилаза	10 2-хлор-4-нитрофенил-α-D-мальтотриозид [Амилаза] → 9 НФФ + 2-хлор-4-нитрофенил-α-D-мальтозид + Мальтотриоза + Глюкоза	405	Отделенную сыворотку или плазму нельзя оставлять при комнатной температуре более чем на 8 часов. Если тестирование не завершено через 8 часов, необходимо поместить образцы на 2–8 °С. Если тестирование образцов не завершено через 48 ч или отделенная сыворотка хранится более 48 ч, образцы должны быть заморожены при –20 °С
Фосфор	Неорганический фосфор + H ₂ SO ₄ + Молибдат аммония → Невосстановленный фосфорномолибденовый комплекс	340	После забора и фракционирования сыворотки концентрация фосфата не изменяется как минимум в течение недели при хранении в холодильнике (2–8 °С)

¹ в скобках указан фермент, активирующий биохимическую реакцию или условия ее проведения;

² в качестве тестовых образцов должны использоваться сыворотки без гемолиза;

³ антикоагулянты, такие как оксалаты, фтористые соединения и ЭДТА, приводят к заниженным результатам данного метода;

⁴ показатель определяется в цельной крови.

кратом натрия в щелочной среде (цветная реакция Яффе, метод Поппера) [6, 8] с образованием окрашенного комплекса, поглощающего излучение при 510 нм (таблица). Скорость образования окраски пропорциональна концентрации креатинина в образце.

ПОКАЗАТЕЛИ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

Билирубин — желто-красный пигмент; представляет собой линейный тетрапиррол. Большая часть его в организме образуется в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина и цитохромов.

Большинство химических методов определения общего содержания билирубина основаны на реакции между диазотированной сульфаниловой кислотой и билирубином, в результате которой образуется азобилирубин (реакция ван ден Берга [3]), имеющий максимум поглощения УФ-излучения при 560 нм (таблица). Связанный (прямой) билирубин реагирует быстро, несвязанный (непрямой) — после добавления акселераторных веществ, обладающих свойством ускорять реакцию между свободным билирубином и диазореактивом в водной среде путем повышения растворимости или каталитическим способом. В качестве акселераторов используются кофеин и бензоат натрия (метод Йендрашика–Клеггорна–Грофа) [1, 7], кофеин и мочевины, метиловый спирт, ацетамид и диметилсульфоксид (ДМСО).

ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Глюкоза — основной углевод, присутствующий в периферической крови. Окисление глюкозы — главный путь получения клетками энергии в организме.

Первые энзиматические методы для определения содержания глюкозы были основаны на использовании глюкозооксидазы, катализирующей окисление глюкозы. В начале 50-х гг. Keston модифицировал данный метод, используя ферментативную систему оксидаза/пероксидаза и o-дианизидин. После этого были предложены различные альтернативные хромогенные системы: так, канцерогенный o-дианизидин заменен на фенол с 4-аминоантипиринном. Данный метод оказывает меньшее влияние на результаты анализа и не имеет недостатков ранее предложенных методов: β-D-глюкоза окисляется глюкозооксидазой с образованием D-глюконовой кислоты и пероксида водорода [1]. В присутствии пероксидазы пероксид водорода, л-гидроксibenзолсульфоновая кислота (л-ГБС), 4-аминоантипирин и фенол образуют хинониминный краситель [8] (табл.). Концентрация образовавшегося в результате реакции окрашенного продукта пропорциональна концентрации глюкозы.

К числу спектрофотометрических методов, получивших широкое распространение, можно отнести метод определения глюкозы по цветной реакции с o-толуидином (метод Гульмана) [1, 6, 7], состоящий в определении интенсивности окрашенного раствора при взаимодействии o-толуидина с глюкозой при нагревании в растворе уксусной кислоты.

Молочная кислота (лактат) — продукт метаболизма, образующийся в результате молочной ферментации глюкозы и гликогена, который накапливается при физических упражнениях с высокой нагрузкой как результат повышения гликолитической активности. Формирование АТФ связано с образованием лактата и H⁺: при развитии утомления повышенные уровни лактата коррелируют со снижением силы.

Для определения концентрации лактата традиционно используют спектрофотометрический метод. Принцип определения основан на способности молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образовывать уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом (C₆H₅C₆H₄OH), и дает фиолетово окрашенные продукты [6, 7]. Фотометрирование проводят при длине волны 565 нм. Реакция очень чувствительна, поэтому надо строго выдерживать все условия выполнения исследования.

В настоящее время все чаще применяют ферментные методы определения молочной кислоты, основанные на измерении скорости окисления лактата лактатоксидазой (реже лактатдегидрогеназой) до пирувата и перекиси водорода. Затем в присутствии 4-аминоантипирина и натриевой соли этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-m-толуидина (TOOS) пероксидаза катализирует реакцию перекиси водорода с образованием окрашенного комплекса, абсорбция которого измеряется при 550 нм [8]. Абсорбция прямо пропорциональна концентрации лактата в исследуемом образце (таблица).

ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

Триглицериды (триацилглицерины) — это нейтральные жиры, обеспечивающие клетки энергией. Как и холестерин, они доставляются к клеткам тела с помощью липопротеинов крови.

Стандартные методы определения концентрации триглицеридов основаны на использовании как ферментного, так и щелочного гидролиза с высвобождением глицерина. Современные методы основаны на использовании энзиматического гидролиза [8] и количественного определения содержания триглицеридов, так как они имеют высокую специфичность, и фосфолипиды не влияют на его результаты: триглицериды гидролизуются липазой, концентрация высвобождающегося глицерина определяется энзиматической реакцией, в результате которой образуется хинониминный краситель (таблица).

При использовании химических методов глицерин, освобожденный омылением триглицеридов, окисляют до формальдегида, концентрация последнего определяется спектрофотометрически с применением реакции Hantzsch (метод Сардеса–Маннинга) [7], по цветной реакции с хромотроповой кислотой [3] или ацетилацетоном [10].

Холестерин представляет собой вторичный одноатомный ароматический спирт, в молекуле которого имеется общее для всех стероидов полициклическое ядро циклопентанпергидрофенантрена.

Энзиматические методы определения содержания холестерина, основанные на использовании холестеринэстеразы, оксидазы и реакции Триндера, вытеснили более ранние методы. Allian и соавт. разработали общий ферментативный метод, в котором при окислении холестерина в присутствии пероксида водорода, пероксидазы, 4-аминоантипирина и фенола образуется хинониминный краситель. Реагент содержит л-ГБС и фенол, образующие краситель с максимумом поглощения при 520 нм, а также сурфактант для обеспечения полного протекания реакции [8]. Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации холестерина в пробе. Реакции получения хромогена предшествует гидролиз эфиров холестерина с образованием холестерина (таблица).

Несмотря на высокую специфичность энзиматических методов, большое распространение для определения холестерина в сыворотке крови получил метод Ильяка [1, 3, 5–7, 9]. В его основу положена модифицированная реакция Либермана–Бурхарда, которая приводит к изумрудно-зеленому окрашиванию раствора в присутствии холестерина и смеси ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты.

Фосфолипиды (фосфатиды, ФЛ) представляют собой группу липидов, содержащих помимо фосфорной

кислоты (в качестве обязательного компонента) также спирт (обычно глицерин), жирные кислоты и азотистые основания. По природе спирта ФЛ можно разделить на фосфоглицериды, фосфосфингозины и фосфоинозитиды.

Об общей концентрации ФЛ обычно судят по содержанию в них липидного фосфора, на долю которого приходится 4% молекулярного веса ФЛ (справедливо для фосфотидилхолинов (лецитинов) [7]). Так, метод Бартлетта–Ушера основан на минерализации липидов с помощью хлорной кислоты. Неорганический фосфор, взаимодействуя с молибдатом аммония, образует фосфомолибденовую кислоту, которую восстанавливают эйконогеном и пиросульфитом натрия в молибденовую синь. По степени окраски вычисляют количество неорганического фосфора, содержащегося в ФЛ.

Поскольку данный метод достаточно трудоемкий, требует проведения стадии экстракции липидов (как правило по методу Фолча [3, 7]), в рутинных лабораторных исследованиях используют энзиматический метод [8], основанный на гидролизе ФЛ фосфолипидов. Высвобождаящийся холин затем окисляется холинсцидазой в бетанин с образованием перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода связывается с 4-аминофеназоном и дихлорфенолом с формированием комплекса кинонимина, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ФЛ (таблица).

ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА

Кальций — это наиболее распространенный и один из наиболее важных элементов в организме человека и животных. Примерно 99% всего кальция находится в костях.

Определение кальция в сыворотке крови основано на образовании окрашенного комплекса с Арсеназо III [7], интенсивность окраски раствора которого прямо пропорциональна концентрации кальция в образце. Арсеназо III — металлокомплекс из группы диазокомплексобразователей, которые имеют неодинаковое сродство к различным ионам металлов. Наибольшее сродство проявляется к ионам Th^{4+} , UO_2^{2+} , Zr^{2+} , Pu^{4+} , меньшее — к ионам Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{+} . Из этих ионов в сыворотке крови в значительном количестве присутствует только ион Ca^{2+} . Соотношение кальция и присителя для образования комплекса: одна часть образца на 100 частей реагента.

В качестве комплексона при определении кальция может быть использован глиоксаль-бис-[2-оксианил] [3, 6] и *о*-крезолфталеин [6, 8, 9].

Магний — это второй по распространенности внутриклеточный катион в организме животных и человека после калия, он участвует в большом количестве ферментативных и метаболических процессов.

Метод определения концентрации магния впервые был предложен Kramer, Tisdall, Briggs и соавт. в 20-х гг. Впоследствии было разработано несколько методик его определения: комплексометрическое титрование с ЭДТА, флуориметрическая процедура с использованием специфических хелатирующих агентов и спектрофотометрический метод, в основе которого лежит реакция титана желтого и гидроксида магния с образованием красного пигмента [3, 5–7, 9]. Все эти методы имели недостатки, которые отражались на точности результатов. Атомная абсорбция является методом, позволяющим наиболее точно определять

концентрацию магния. Данный метод требует дорогостоящего оборудования и большого объема исследуемого материала.

Совсем недавно был предложен спектрофотометрический метод, который стал наиболее популярным. В качестве окрашивающих агентов используют кальмагит, ксилонидиловый голубой [8], эриохромовый черный Т, магон [6] или метилтимоловый голубой. При использовании металлохромного индикатора кальмагита нет необходимости проводить депротенинизацию, и результаты анализа имеют высокую сходимость с данными атомной абсорбции: ионы магния реагируют с кальмагитом в щелочной среде, при этом формируется комплекс, имеющий красное окрашивание (табл.). Абсорбция измеряется при 530 нм и пропорциональна концентрации магния в исследуемом образце. Влияние кальция устраняется при использовании ЭДТА. Влияние тяжелых металлов и белков устраняется при использовании цианидов и сурфактанта соответственно.

Фосфор — это важнейший элемент для формирования тканей кости, и он необходим для нормального функционирования каждой клетки организма. Примерно 85% фосфора организма животных и человека находится в костях и зубах.

Определение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови основано на взаимодействии молибдата аммония с фосфатами в кислой среде с образованием фосфорномолибденового комплекса, имеющего синюю окраску, без проведения депротенинизации [8]. Поглощение при 340 нм прямо пропорционально количеству неорганического фосфора, содержащегося в образце (таблица). Возможно последующее восстановление полученного комплекса эйконогеном [3] или аскорбиновой кислотой [1, 7].

Неорганический фосфор в сыворотке крови может быть определен и с ванадат-молибденовым реактивом (по Пулсу в модификации В.Ф. Коромыслова и Л.А. Кудрявцевой) [5–7, 9], с которым фосфор дает лимонно-желтое окрашивание. Максимум светопоглощения комплекса приходится на 420 нм.

Калий и натрий. Традиционно измерение концентрации натрия и калия в биологических жидкостях проводится методом пламенной фотометрии [5–7, 9], который представляет собой один из видов эмиссионного спектрального анализа, основанного на фотометрировании излучения элементов в пламени. Натрий окрашивает пламя в ярко-желтый цвет, а калий — в слабый красно-фиолетовый. Добавление к распыленным растворам органических реагентов, являющихся поверхностно-активными веществами, увеличивает яркость свечения пламени.

Однако современный уровень развития биохимического анализа позволяет проводить определение концентрации ионов натрия и калия спектрофотометрическими методами, которые являются более доступными в сравнении с методами элементного анализа. Уровень натрия определяется ферментативным методом по степени активности натрийзависимой β -галактозидазы с *о*-нитрофенил- β -D-гликозидом в качестве субстрата. Абсорбция образующегося *о*-нитрофенила при 405 нм пропорциональна концентрации натрия.

Многие описанные методы спектрофотометрического определения калия или натрия требовали предварительной депротенинизации сыворотки или плазмы. В настоящее время количество калия определяется с помощью тетрафенилбората натрия в специально

приготовленной смеси для получения коллоидных взвесей, мутность которой пропорциональна концентрации калия в диапазоне от 2 до 7 экв/л [8].

Железо — микроэлемент, содержащийся в организме в наибольшем количестве. Основная часть железа расположена внутри гема в гемоглобине, каталазе, миоглобине, пероксидазе и цитохромах. Железо аккумулируется в форме, связанной с ферритином или гемосидерином, а переносится с помощью трансферрина.

Как было сказано, практически все железо в организме связано белками. Железо в свободной форме не только не растворимо, но и токсично. Принципиально важен тот факт, что образцы сыворотки крови следует анализировать не только на общее железо, но и на железосвязывающую способность, так как оба вышеуказанных параметра крайне важны для диагностики различных типов анемий и заболеваний печени. Определение железа основано на том, что при добавлении содержащего гидроксилламин кислотного буферного раствора железо сыворотки высвобождается из Fe^{3+} -трансферринового комплекса. Железо (III) восстанавливается до железа (II). Ионы железа реагируют с окрашенным агентом (феррозин), что приводит к образованию яркоокрашенного комплекса [8]. Абсорбция измеряется фотометрически при длине волны 560 нм (таблица).

В качестве альтернативного можно использовать метод определения железа по цветной реакции с β -фенантролином [3, 6, 7]: белки осаждают трихлоруксусной кислотой, которая при прогревании разрушает комплекс железа с трансферрином. Для установления оптимальной величины pH (4,8–5,0) добавляют ацетат аммония, а для восстановления всего железа — гидрозин. Двухвалентное железо образует окрашенный комплекс с β -фенантролином, который переведен в сульфатированную форму добавлением хлорсульфоновой кислоты.

Хлориды. Для клинического анализа важно определять концентрацию хлоридов, так как они регулируют осмотическое давление внеклеточной жидкости и играют значительную роль в кислотно-щелочном балансе [2].

В 1978 г. хлориды определяли по реакции precipitation в виде хлорида серебра после титрования избытка нитрата серебра тиоцианатным раствором. С этого времени было предложено много методов, включая ртутное титрование с использованием в качестве индикатора дифенилкарбазона [3, 6]. Электрохимический метод был впервые представлен в 1950 г. Он основан на инкубации хлоридсодержащего раствора с электродами, выделяющими катион серебра в кислой среде. Время, необходимое для образования осадка в виде хлорида серебра, прямо пропорционально концентрации хлоридов в исследуемом растворе. Больше распространение в биохимическом анализе получил метод, предложенный в 1950 г., в основе которого лежит следующий принцип: ионы хлора замещают тиоцианат из неионизированного тиоцианата ртути, при этом образуется хлорид ртути и тиоцианат-ионы [8]. Образовавшиеся тиоцианат-ионы реагируют с ионами железа с формированием окрашенного комплекса, максимум светопоглощения которого приходится на 480 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации хлоридов в исследуемой сыворотке крови.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Щелочная фосфатаза (ЩФ) (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, фосфомоноэстераза 1) — фермент гидролаза, отщепляющий фосфат (дефосфорилирование) от многих типов молекул, например, нуклеотидов, белков и алкалоидов. Фермент проявляет наибольшую активность в щелочной среде (pH от 8,6 до 10,1).

Концентрация ЩФ определяется по изменению скорости гидролиза различных фосфатных эфиров [5–9]. *n*-Нитрофенилфосфат — один из таких эфиров, использовался как субстрат Fujita в 1939 г. Bowers и McComb в дальнейшем модифицировали процедуру кинетического анализа. В 1974 г. Комитет по энзимологии Скандинавского общества клинической химии и клинической физиологии принял модификацию данного метода и рекомендовал его в качестве референсного. Скорость увеличения поглощения излучения при 405 нм, обусловленная образованием *n*-нитрофенола в процессе гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, пропорциональна активности фермента [8]. Более известен как метод Бессея–Лоури–Брока [1, 3].

В качестве других энзиматических методов можно использовать метод Боданского и Кинга–Армстронга. Метод Боданского основан на ферментативном гидролизе β -глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора, определяемого фотометрически [3, 6–7, 9]. А в основе метода Кинга–Армстронга лежит ферментативное расщепление фенилфосфата [3, 6]. Освобожденный в результате реакции фенол определяют фотометрически с реактивом Фолина.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (L-лактат: NAD-оксидоредуктаза) — гликолитический фермент, открытый Мейергофом в 1918 г., катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную. Обнаружены пять изоферментов ЛДГ, отличающихся по мобильности.

Возможно измерение активности ЛДГ по прямой и обратной реакции (таблица). При оптимальных условиях реакция может протекать как в прямом, так и в обратном направлении. Хотя использование в кинетических измерениях реакции превращения лактата лития в пируват предпочтительнее, так как: 1) скорость реакции линейна на широком диапазоне активности фермента, 2) не требуется предварительная инкубация реакционной среды, 3) реагенты более стабильны. Кинетический метод основан на том, что ЛДГ катализирует окисление L-лактата до пирувата в присутствии NAD, который одновременно восстанавливается до NADH (оптический тест Варбурга) [8]. Скорость образования NADH измеряется при 340 нм, она прямо пропорциональна активности ЛДГ в сыворотке.

Широкое распространение получил и динитрофенилгидразиновый метод [1, 3, 6, 7], основанный на определении пирувата (пировиноградной кислоты) по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (метод Севела–Товарека).

Креатинкиназа (КК) (АТФ: креатин-N-фосфотрансфераза) — фермент, катализирующий обратимую реакцию фосфорилирования креатина.

Изначально определение КК было основано на измерении количества образованного АТФ (таблица). Усовершенствованный метод был описан Nielson и основан на добавлении соединений, содержащих сульф-

гидрильную группу и АМФ². Данный метод гарантирует максимальную активность КК и ингибирование активности аденилаткиназы: КК способствует превращению креатинфосфата и АДФ³ в креатин и АТФ. Затем АТФ и глюкоза превращаются в АДФ и глюкозо-6-фосфат при участии гексокиназы. Глюкозо-6-фосфат окисляется до 6-фосфоглюконата под действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, что приводит к уменьшению содержания NAD [8]. Концентрация NADH, измеренная при 340 нм, прямо пропорциональна активности КК в сыворотке.

α -Амилаза (1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза) — один из первых открытых ферментов; катализирует эндогидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров.

В основе спектрофотометрического метода определения амилазы лежит реакция гидролиза 2-хлор-4-нитрофенил- α -D-мальтатриозида α -амилазой с высвобождением 2-хлор-4-нитрофенила (ХНФ) и образованием 2-хлор-4-нитрофенил- α -D-мальтозида, мальтотриозы и глюкозы [8]. Скорость образования ХНФ измеряется фотометрически, величина поглощения пропорциональна концентрации амилазы в образце (таблица).

Активность амилазы может быть оценена амилотометрическим методом и методом Каравея (со стойким крахмальным субстратом) [1, 3, 6, 7], основанным на фотометрическом определении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза.

Аспартаминотрансфераза (АсАТ, АСТ) и аланинаминотрансфераза (АлАТ, АЛТ) катализируют обратимый перенос аминокислот с L-аспарагиновой кислоты и L-аланина на α -кетоглутаровую кислоту.

УФ-метод для определения АлАТ был описан Henley в 1955 г., Wroblewski и La Due в 1956 г., Henry и соавт. в 1960 г. В 1980 г. Международная федерация клинической химии (МФКХ) рекомендовала совместное использование лактатдегидрогеназы-NADH. Принцип метода основан на каталитической реакции переноса аминокислоты с L-аланина на α -кетоглутарат с образованием пирувата и L-глутамата под действием АлАТ. ЛДГ подвергается окислению, при этом NADH окисляется до NAD. Уровень снижения абсорбции прямо пропорционален активности АлАТ [6, 8, 10].

Первые кинетические измерения активности АсАТ в диагностических целях были описаны Karmen и соавт. В 1955 г. они проводились с использованием сопряженной реакции в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ) и NADH. Данная система измерения была значительно улучшена и оптимизирована в 1960 г. Henry и соавт. В 1977 г. МФКХ рекомендовала референсный метод для измерения активности АсАТ, основанный на методе Karmen [8]. Ферментативный метод определения концентрации АсАТ основан на следующей последовательности реакций: АсАТ катализирует перенос аминокислоты между L-аспаратом и 2-оксоглутаратом. Образующийся в первой реакции оксалоацетат реагирует с NADH в присутствии МДГ с образованием NAD. Активность АсАТ определяется измерением скорости окисления NADH при 340 нм (таблица). ЛДГ превращает эндогенный пируват, содержащийся в образце, в лактат в течение лаг-фазы, предшествующей измерению.

Возможно определение активности аминотрансфераз по методу Райтмана-Френкеля (1957), который основан на получении окрашенных динитрофенилгидразонов щавелевоуксусной (оксалоацетата) и пиридиноградной (пирувата) кислот [3, 6, 7].

Холинэстераза. Различают два типа холинэстераз — ацетилхолинэстеразу, или истинную холинэстеразу (АХЭ, ацетилхолин-ацетилгидролаза), и псевдохолинэстеразу (ХЭ, ацилхолин-ацетилгидролаза). Истинная холинэстераза содержится преимущественно в эритроцитах, нервной и мышечной тканях; псевдохолинэстераза — в сыворотке крови, печени, поджелудочной железе. АХЭ и ХЭ различаются по ряду свойств и прежде всего по субстратной специфичности. Наиболее специфичным субстратом для истинной холинэстеразы является ацетилхолин, для псевдохолинэстеразы — бутирилхолин. Псевдохолинэстераза не отличается строгой субстратной специфичностью и гидролизует такие субстраты, как ацетилхолин, бензоилхолин, сукцинилхолин и другие эфиры холина.

Принцип определения активности холинэстеразы в сыворотке крови основан на гидролизе ацетилхолинхлорида под действием фермента с образованием уксусной кислоты и холина [3, 6, 7]. Уксусная кислота сдвигает pH буферного раствора, что устанавливается с помощью индикатора (фенолового красного [3, 6], фиолетового синего [7]) по изменению цвета буферного раствора.

Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови возможно методом с субстратом бутирилтиохолина йодидом [6, 7]. В этом случае холинэстераза гидролизует субстрат с образованием масляной кислоты (бутирата) и тиохолина. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойной кислотой) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензоата, окрашенного в желтый цвет. Активность холинэстеразы пропорциональна скорости изменения поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоатом в индикаторной реакции при 405 нм (таблица).

γ -Глутамилтранспептидаза (ГГТ, γ -глутамил-транспептидаза) — фермент, катализирующий реакцию переноса γ -глутамилового остатка глутаминовой кислоты на акцепторный пептид или на L-аминокислоту. ГГТ содержится почти во всех органах, наибольшая удельная активность определяется в ткани почек.

Принцип кинетического спектрофотометрического метода определения активности основан на том, что ГГТ катализирует реакцию переноса L- γ -глутамилового остатка с L- γ -глутамил-L-нитроанилида на глицилглицин (метод Орловского и др.). Количество освобожденного в ходе реакции L-нитроанилина измеряется и служит мерой активности ГГТ [6, 7]. В качестве субстрата могут быть использованы L- γ -глутамиланилид (метод Гольдберга и др.) и производное L- γ -глутамил-L-нитроанилида — L- γ -глутамил-3-карбокситетра-4-нитроанилид. В качестве буферов могут применяться трис-буфер, глицилглициновый, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиоловый. Вид буфера почти не оказывает влияния на активность фермента. Преимущество глицилглицинового буфера состоит в том, что он одновременно является и буфером, и акцептором γ -глутамилового остатка [6].

ПОКАЗАТЕЛИ ОБЩЕГО КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ

Гемоглобин (ГГ). Из различных методов определения уровня ГГ в крови наиболее широко используется

цианметгемоглобиновый метод. В цианметгемоглобиновом методе эритроциты лизируются стромализирующим агентом в присутствии сурфактанта, ГГ выделяется в раствор. ГГ окисляется до метгемоглобина под действием ферроцианида, а затем метгемоглобин преобразуется в стабильное соединение — цианметгемоглобин при взаимодействии с KCN. Абсорбцию цианметгемоглобина измеряют при 540 нм, и интенсивность окраски пропорциональна концентрации гемоглобина (таблица).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, достижения аналитической химии позволяют проводить определение основных биохимических показателей сыворотки крови сельскохозяйственных животных с уникальной селективностью и необходимой точностью.

Особую специфичность проявляют энзиматические методы, в которых определение активности фермента проводится по скорости изменения концентрации субстрата или аддукта реакции; количественное определение субстрата становится возможным при получении окрашенного продукта реакции. Использование энзиматических методов минимизирует стадии подготовки пробы и тем самым существенно сокращает время анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Е.А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Россельхозиздат, 1982. — 254 с.
2. Козинец Г.И. Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение. — М.: Триада-Х, 1998. — 104 с.

3. Колб В.Г., Камышиников В.С. Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов). — Минск, Беларусь, 1976. — 310 с.

4. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Клиническая гематология животных. — М.: Колос. — 1974. — 399 с.

5. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микробиологические: справочник / сост. Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина [и др.]; под ред. Б.И. Антонова. — М.: Агропромиздат, 1991. — 287 с.

6. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.]; под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / под ред. И.П. Кондрахина. — М.: КолосС, 2004. — 520 с.

8. Методические указания по биохимическому исследованию крови животных с использованием диагностических наборов: утв. ГУВ МСХиПРБ 27.11.2007 г. / И.Н. Дубина, А.П. Курдеко, И.В. Фомченко, И.И. Смилгин. — Витебск: УО ВГАВМ, 2008. — 60 с.

9. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях: утв. ГУВ МСХ СССР 03.04.1981 г. / В.Т. Самохин, П.Е. Петров, И.М. Беляков [и др.]. — М.: ВАСХНИЛ, 1981. — 87 с.

10. Об унификации клинических лабораторных методов исследования (вместе с «Методическими указаниями по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования»): Приказ Минздрава СССР от 21.11.1979 г. №1175.

² АМФ — аденозинмонофосфат (англ. AMP);

³ АДФ — аденозиндифосфат (англ. ADP).

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРОТИВОЯЩУРНЫХ АНТИТЕЛ В РЕАКЦИИ ЖИДКОФАЗНОГО БЛОКИРУЮЩЕГО «СЭНДВИЧ»-ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Н.Н. Луговская¹, Е.Н. Калинина², К.С. Малкова³, О.В. Воробьева⁴, Г.М. Горячева⁵, Т.К. Майорова⁶

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

² ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: malkova@arriah.ru

⁴ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

⁵ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

⁶ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mayorova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье описан процесс валидации методики определения уровня противоящурных антител в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА для типов ящура А, О и Азия-1. Произведён анализ результатов и определены основные валидационные характеристики: чувствительность, специфичность, точность, согласованность, прогностичность положительных и отрицательных результатов, воспроизводимость, промежуточная прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости. Результаты валидации методики постановки ИФА удовлетворяли критериям приемлемости.

Ключевые слова: валидация, иммуноферментный анализ, антитела, ящур.

VALIDATION OF THE TECHNIQUE AIMED AT THE DETERMINATION OF FMD ANTIBODIES IN LIQUID PHASE BLOCKING SANDWICH ELISA

N.N. Lugovskaya¹, Ye.N. Kalinina², K.S. Malkova³, O.V. Vorobyova⁴, G.M. Goryacheva⁵, T.K. Mayorova⁶

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

² Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: malkova@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

⁵ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

⁶ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mayorova@arriah.ru

SUMMARY

The paper describes the process of the validation of the technique aimed at the determination of FMD antibodies in liquid phase blocking sandwich ELISA for FMD types A, O and Asia1. The results were analyzed and the following main validation characteristics were determined: sensitivity, specificity, accuracy, consistency, predictability of positive and negative results, reproducibility and intermediate precision under the conditions of repeatability and reproducibility. The results of the ELISA procedure validation were in compliance with the acceptability criteria.

Key words: validation, ELISA, antibodies, FMD.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей задачей любых диагностических лабораторных исследований, в том числе и на ящур, является получение достоверных результатов, обеспечить которые призвано использование надёжных, стабильных тест-систем. Одним из самых востребованных методов в диагностике ящура является иммуноферментный анализ (ИФА). Для оценки пригодности методики проведения ИФА необходим процесс валидации, включающий оптимизацию, стандартизацию, определение объективных параметров диагностической тест-системы, именуемых валидационными характеристиками. К основным валидационным характеристикам относятся чувствительность, специфичность, точность, прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата, k-критерий и т.д. [2, 5–7, 9]. Обеспечение достоверности полученных результатов ИФА возможно лишь при качественном проведении исследований.

Для оценки степени достижения необходимого качества осуществляется анализ повторяемости (сходимости) и воспроизводимости [3, 4]. Данный анализ используется не только для того, чтобы продемонстрировать точность методики и стабильность компонентов реакции, но и показать, насколько точность, аккуратность и квалификация операторов влияют на возможность использования данного метода для решения конкретных диагностических задач.

Целью работы явилась оценка пригодности методики определения уровня противоящурных антител в сыворотке крови животных в реакции жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА (ЖБС ИФА) для проведения диагностических исследований на ящур типов А, О, Азия-1 в соответствии с инструкцией по применению «Набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе», производимого в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый материал. Материалом для исследования служили пробы сыворотки крови от вакцинированных и невакцинированных, клинически здоровых сельскохозяйственных животных, доставленных для исследования на наличие антител против ящура типов А, О, Азия-1 в референтную лабораторию диагностики ящура ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») из Киргизской Республики и 42 регионов РФ, и образцы сыворотки крови, полученные при контроле вакцины в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Для подсчёта диагностической чувствительности использовались результаты мониторингового исследования проб сыворотки крови от вакцинированных животных в течение 2013 г. — 16 368 проб, 2014 г. — 29 914 проб, 152 пробы сыворотки крови от КРС, отобранных в ходе проведения контроля противоящурной вакцины 18 серий; для подсчёта диагностической специфичности и определения позитивно-негативного порога — 1 961 и 306 проб сыворотки крови от невакцинированного КРС соответственно. Для оценки промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов ИФА, полученных 4 операторами при исследовании проб в двух повторностях на одном планшете и разных планшетах в разные дни и сроки, тестировали 336 образцов сыворотки крови от вакцинированного КРС, присланных из Киргизской Республики, и 3 стандартные контрольные

пробы: сильноположительную, слабоположительную и отрицательную сыворотку. Для оценки воспроизводимости в ходе проведения межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) методики постановки ИФА по определению уровня противоящурных антител в рамках ФГБУ «ВНИИЗЖ» использовали панель из 11 образцов сыворотки крови животных, включающую: нормальную сыворотку крови КРС; сыворотку крови КРС, вакцинированного против ящура типов С № 564, САТ-2, О₁ Маниса, О ПанАзия-2, А и Азия-1; сыворотку крови овцы, переболевшей оспой; сыворотку крови свиньи до и после экспериментальной иммунизации против везикулярной болезни свиней.

ИФА. При валидации методики определения уровня противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА реакцию проводили в соответствии с «Инструкцией по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе» (организация-разработчик: ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир), введённой в действие 11.07.2013 г., по стандартному протоколу на поверенном оборудовании.

Относительные чувствительность, специфичность и точность определяли при параллельном тестировании разных выборок проб сыворотки крови КРС в валидируемой тест-системе ИФА и с использованием коммерческих диагностических наборов:

– LPB-ELISA for detection of antibodies of FMDV (Serotype A or O, Asia1), Пирбрайтский институт, Великобритания;

– SPCE for antibodies specific to FMDV Serotype A or O, Asia1, IZSLER, Брешиа, Италия;

– PrioCHECK FMDV type A or O, Asia1, Prionics AG, Лелстад, Нидерланды.

Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией к набору.

Реакция микронейтрализации (PMH). Титры вируснейтрализующих антител в образцах сыворотки крови КРС и свиней определяли в PMH на перевиваемой культуре клеток IB-RS-2 в 96-луночных культуральных планшетах фирмы Costar против 100 ТЦД₅₀ вируса ящура типа А₂₂ Ирак/64, О ПанАзия-2, Азия-1 Таджикистан/11 в соответствии с «Методическими указаниями по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура» (2002) и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [8]. Конечную точку титра антител рассчитывали как конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД₅₀ гомологичного вируса в 50% лунок, и выражали в десятичных логарифмах (lg).

Обработка результатов ИФА. При выборе точки разделения положительного/отрицательного (позитивно-негативный порог) и оценке воспроизводимости и промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов ИФА использовали статистическую обработку и анализ полученных данных, для чего вычисляли среднее значение PI (M или μ), стандартное отклонение SD (или σ), коэффициент вариации CV, точку разделения положительного/отрицательного (PNP) по следующим формулам:

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n) \quad (1);$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2);$$

$$CV = SD / M \times 100\% \quad (3);$$

$$PNP = M + 2SD \quad (4).$$

Чувствительность (Se), специфичность (Sp), точность (Ac) ЖБС ИФА, диагностическую (D) или относительную (R); k-критерий (k); позитивное прогностическое значение теста (PPV) и негативное прогностическое значение теста (NPV) вычисляли по формулам 5–10, используя данные, приведённые в матрице 2x2 для вычисления валидационных характеристик (табл. 1).

Чувствительность, или долю истинно положительных результатов при исследовании в ЖБС ИФА проб, полученных от животных с известным положительным статусом, определяли как:

$$Se = \frac{a}{a + c} \times 100\% \quad (5).$$

Специфичность, или долю истинно отрицательных результатов при исследовании в ЖБС ИФА проб, полученных от животных с известным отрицательным статусом, определяли как:

$$Sp = \frac{b}{b + d} \times 100\% \quad (6).$$

Точность, или долю подтверждённых результатов среди общего количества проб с известным статусом, определяли как:

$$Ac = \frac{a + b}{n} \times 100\% \quad (7).$$

k-критерий, или степень согласованности, определяли как:

$$k = \frac{Pr(a) - Pr(e)}{1 - Pr(e)} \quad (8),$$

где $Pr(a) = \frac{a + b}{n}$ — абсолютная согласованность результатов;

$$Pr(e) = \left(\frac{a + d}{n} \times \frac{a + c}{n} \right) + \left(\frac{b + c}{n} \times \frac{b + d}{n} \right) -$$

обобщенная случайная вероятность согласованности результатов.

Таблица 1
Матрица для вычисления валидационных характеристик

Известный/ подтверждённый статус	ЖБС ИФА		
	положительные	отрицательные	всего
положительные	a	c	a+c
отрицательные	d	b	b+d
всего	a+d	b+c	n

a — истинно положительные результаты; d — ложноположительные результаты;
c — ложноотрицательные результаты; n — общее количество исследованных проб.
b — истинно отрицательные результаты;

Позитивное прогностическое значение теста, свидетельствующее о том, что полученные положительные результаты являются фактически положительными в соответствии с истинным диагностическим статусом, определяли как

$$k = \frac{Pr(a) - Pr(e)}{1 - Pr(e)} \quad (9).$$

Негативное прогностическое значение теста, свидетельствующее о том, что полученные отрицательные результаты являются фактически отрицательными в соответствии с истинным диагностическим статусом, определяли как

$$NPV = \frac{(1 - P) \times Sp}{P \times (1 - Se) + (1 - P) \times Sp} \quad (10),$$

где $P = \frac{a + c}{n}$ — превалентность положительных значений.

Критерии приемлемости результатов валидации. Приемлемость результатов валидации оценивали по следующим показателям. Для статистических данных, отражающих воспроизводимость и промежуточную прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости, на основании значений CV, которые определяли только для положительных, статистически значимых результатов. Значение $CV \leq 20\%$ считали приемлемым, $CV \geq 30\%$ — не приемлемым [1, 3].

Валидационные характеристики тест-системы, такие как чувствительность, специфичность, точность, позитивное прогностическое значение теста, негативное прогностическое значение теста, оценивали по k-критерию [4]. Критерии согласованности данных приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Правильность выбора точки разделения положительного/отрицательного имеет решающее значение для диагностических методов. От того, насколько точно квалифицированы результаты исследований, зависит не только правильно поставленный диагноз, но и объективность оценки тест-системы.

Ранее для данной тест-системы ИФА было подсчитано пороговое значение процента ингибции (PI), составлявшее 50%. Подтверждённый через значительный промежуток времени позитивно-негативный порог (PNP) может свидетельствовать о стабильности компонентов и стандартности условий проведения реакции, что в свою очередь влияет на воспроизводимость и достоверность полученных результатов.

Для определения позитивно-негативного порога диагностических тест-систем для 3 типов ящура: А, О и Азия-1 — исследовали параллельно выборку из 306 проб сыворотки крови от невакцинированных, клинически здоровых животных из 5 регионов РФ: Тамбовской, Курской, Белгородской, Рязанской областей и Ненецкого автономного округа. Для каждого типа ящура вычисляли среднее значение PI, стандартное отклонение σ . Значение PNP определяли как сумму $PI_{\text{сред.}}$ и 2σ . Данные расчётов приведены в табл. 3.

Был проведён анализ значений PI и подсчитано количество проб для диапазонов значений PI, соответствующих показателям $PI_{\text{сред.}} - 1\sigma$, $PI_{\text{сред.}}$, $PI_{\text{сред.}} + 1\sigma$,

$PI_{\text{сред.}} + 2\sigma$ (PI_{PNP}), $PI_{\text{сред.}} + 3\sigma$. Плотность распределения значений PI показана на рис. 1.

График, представленный на рис. 1, свидетельствовал о приближённости распределения к нормальной модели гауссова распределения.

Для унификации процедуры обработки результатов исследования, полученных с использованием тест-систем на 3 типа ящура, было найдено среднее пороговое значение PI, которое составило $46,9 \pm 3\%$ ($CV=7,36\%$) с 95% доверительным интервалом и $58,8 \pm 3\%$ ($CV=5,06\%$) с 99% доверительным интервалом. Таким образом, поскольку пороговые значения PI, определённые для каждого из 3 типов ящура (для типа А — 43%, для типа О — 50%, для типа Азия-1 — 47%) при исследовании данной (n=306) выборки проб сыворотки (табл. 3), оказались близки ранее установленному пороговому значению в 50%, точка разделения положительного/отрицательного была подтверждена в ходе настоящих исследований.

При оценке промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости результатов реакции ИФА, полученных разными операторами, повторяемость оценивали по качественным характеристикам: по положительным или отрицательным значениям, при этом подсчитывали количество совпавших и несовпавших результатов. Сходимость (уровень совпадения результатов) при тестировании на одном планшете была высокой для всех 3 тест-систем, средняя сходимость по 3 типам ящура составила 98,86%, несовпадения наблюдали в 1,14% случаев. Повторяемость результатов при тестировании в разные дни была ниже — 90,77%, но на достаточно высоком уровне. Доля несовпавших результатов в среднем была 9,27%.

Также для изучения промежуточной прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости (степень разброса, установленная статистическими методами) результатов внутри одной лаборатории были проанализированы результаты исследования контрольных образцов сыворотки и контроля анти-

Рис. 1. Плотность распределения значений PI, полученных при исследовании в ИФА проб сыворотки крови от невакцинированного, клинически здорового КРС

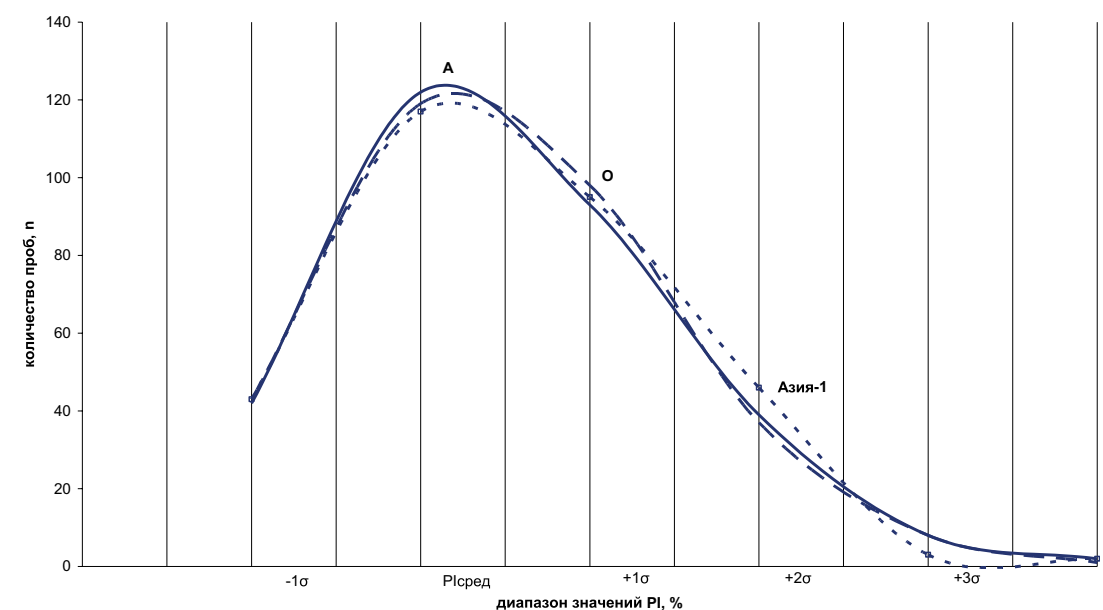


Таблица 2
Критерии согласованности данных

k-критерий	Согласованность
<0	нет согласованности
0–0,20	незначительная
0,21–0,40	слабая
0,41–0,60	умеренная
0,61–0,80	значительная
0,81–1,00	высокая

Таблица 3
Расчёт позитивно-негативного порога

Процент ингибции	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
$PI_{\text{сред.}}$	18,773	27,929	23,539
σ	12,397	11,318	11,632
$PI_{\text{сред.}} + 1\sigma$	31,17	39,247	35,171
$PI_{\text{сред.}} + 2\sigma$ (PI_{PNP})	43,467	50,365	46,803
$PI_{\text{сред.}} + 3\sigma$	55,964	61,88	58,435

гена, проведённые в ходе одной реакции и в разных реакциях в разные дни.

Каждый образец тестировали в целом 394 раза. Как показывал анализ результатов, средние значения PI для контрольных образцов находились в рамках установленного интервала, который соответствовал следующим значениям PI:

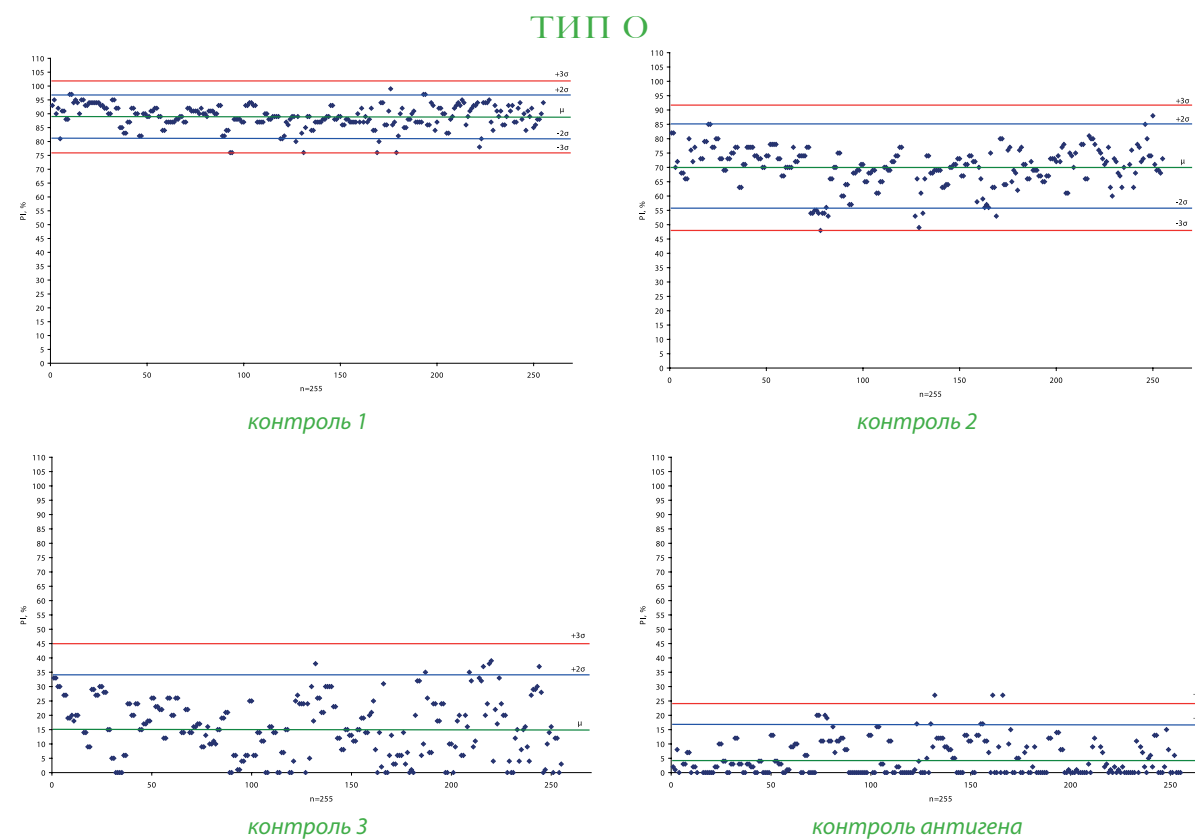
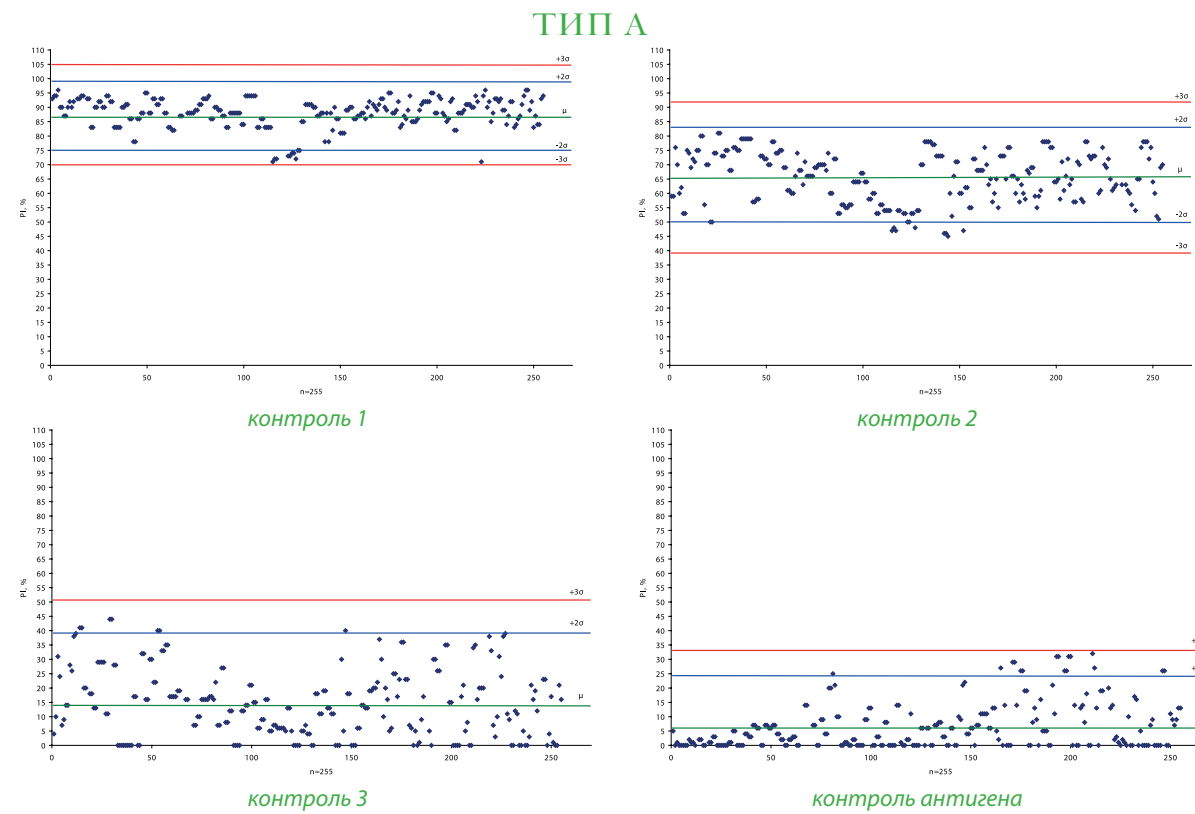
- контроль 1 (сильноположительная сыворотка) — >75%;
- контроль 2 (слабоположительная сыворотка) — 50–75%;
- контроль 3 (отрицательная сыворотка) — <50%.

Значения стандартного отклонения σ не превышали 13,5%, коэффициент вариаций CV соответствовал прием-

лемым значениям для контролей 1 и 2. В среднем по всем 3 тест-системам значение CV для контроля 1 было 4,9%, для контроля 2 — 13,47%. Для контроля 3 и контроля антигена значение CV не определяли, поскольку из-за низких значений PI разброс был значительный, однако, даже с учётом стандартного отклонения, не выходил за рамки допустимого 50% и 30% порога соответственно.

При визуальном изучении карт Шухарта (рис. 2), построенных на основании результатов использования контрольных образцов в разные временные периоды (n=255), видно, что основной массив данных находился в определённой для каждого контроля области и значения PI варьировали в интервале $\mu \pm 2\sigma$.

Выпадающие значения имели скорее случайный, а не систематический характер, вызванный неточностями



ТИП АЗИЯ-1

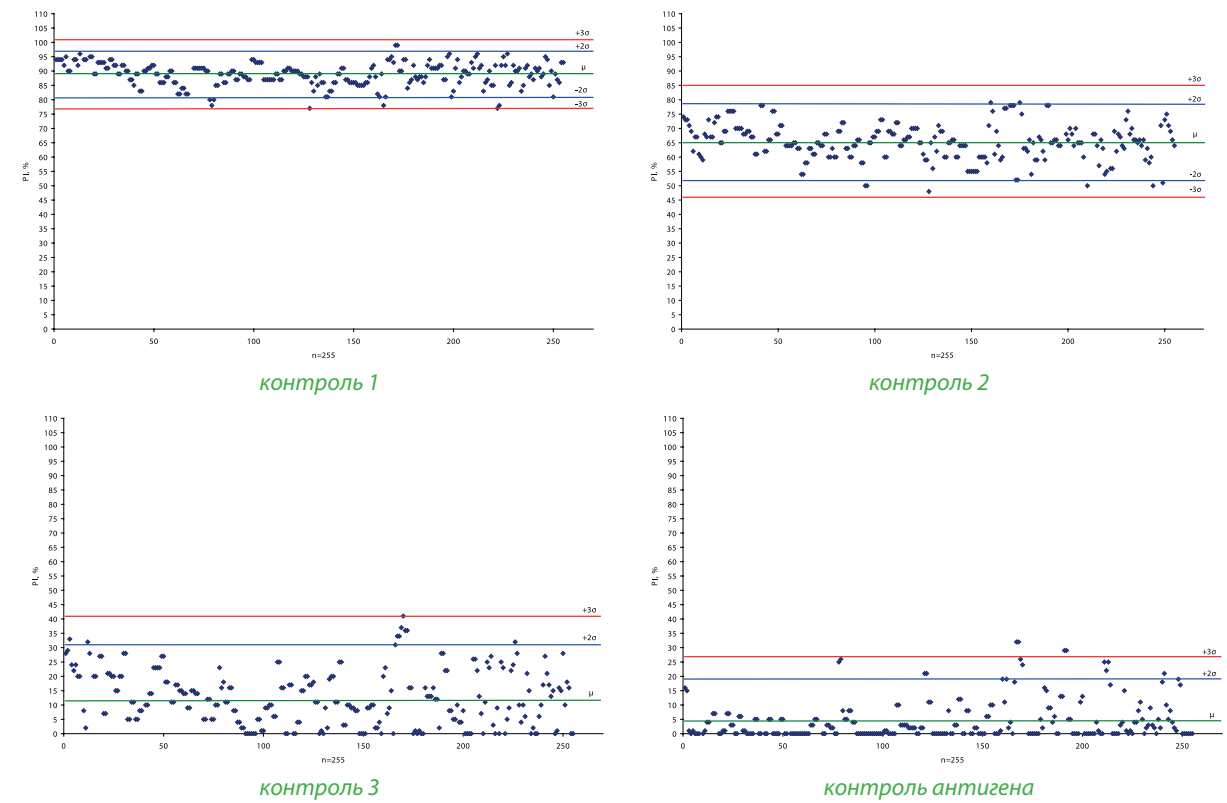


Рис. 2. Контрольные карты для ИФА. Зелёным цветом выделено μ ($PI_{ср.в.}$, n=255), синим — $\mu \pm 2\sigma$, красным — $\mu \pm 3\sigma$

ми в соблюдении протокола или техническими погрешностями, допущенными операторами при постановке реакции ИФА, что легко устранялось в последующих исследованиях.

Оценку воспроизводимости результатов, т.е. возможности с помощью данного метода получать достоверные результаты для одних и тех же испытуемых образцов в разных лабораториях, производили на основании анализа результатов, полученных в ходе проведения МСИ. Для проведения МСИ методики постановки ИФА по определению уровня противоящурных антител в рамках учреждения (приказ зам. директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» № 314 от 16.12.2013 г.) использовали зашифрованную панель из 11 образцов сыворотки крови животных (см. Материалы и методы) (данные не показаны).

Операторам, использующим данную методику постановки ИФА впервые, удалось идентифицировать зашифрованные пробы. Значение CV для положительных испытуемых и контрольных образцов не превышало 19%, что свидетельствовало о приемлемости результатов и хорошей воспроизводимости методики.

Была проведена предварительная оценка тест-системы по основным валидационным характеристикам: диагностическая чувствительность (DSe), диагностическая специфичность (DSp), диагностическая точность (DAc), к-критерий, прогностичность положительного результата (PPV), прогностичность отрицательного результата (NPV). Для этой цели использовали результаты контроля противоящурной вакцины 18 серий. Кровь отбиралась на 21 сут. после иммунизации (табл. 4). Расчёты диагностических характеристик тест-системы представлены в табл. 5.

Для оценки диагностической чувствительности и точности в реальных условиях использовали результаты мониторинговых исследований на ящур по Волгоградской области в 2014 году. Данный регион был выбран не случайно. Мониторинговый контроль на ящур в этом регионе осуществлялся на протяжении нескольких лет как ФГБУ «ВНИИЗЖ», так и ГБУ «Волгоградская областная ветеринарная лаборатория» с использованием наборов производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Результаты исследований разных лабораторий согласовывались между собой. К тому же в Волгоградской области вакцинация и отбор проб проводились строго в соответствии с планом, пробы доставлялись своевременно, и была предоставлена точная информация о возрасте животных и применённых вакцинах. Поскольку статус животных был определён с большой долей достоверности, образцы сыворотки крови КРС из данного региона были использованы для валидации методики, что не противоречит рекомендациям МЭБ по подбору проб [6]. Для оценки диагностической специфичности также использовали пробы сыворотки крови от клинически

Таблица 4
Результаты исследования в ИФА на ящур типов А, О, Азия-1 образцов сыворотки крови КРС, отобранных в ходе контроля противоящурной вакцины

Диагностический статус животных	Положительные на тип А/О/Азия-1	Отрицательные на тип А/О/Азия-1	Всего
вакцинированные против ящура типа А/О/Азия-1	66/105/65	10/11/13	76/116/78
невакцинированный контроль	0/0/0	26/36/30	26/36/30
всего	66/105/65	36/47/43	102/152/108

Таблица 5
Диагностические характеристики для реакции ИФА на ящур типов А, О, Азия-1

Диагностические характеристики	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
DSe	86,8%	90,5%	83,3%
DSp	100%	100%	100%
DAc	90,2%	92,8%	88,0%
k-критерий	0,77	0,819	0,736
PPV	1,0	1,0	1,0
NPV	0,723	0,766	0,698

Таблица 6
Результаты исследования в ИФА на ящур типов А, О, Азия-1 образцов сыворотки крови КРС с известным диагностическим статусом

Диагностический статус животных	Положительные на тип А/О/Азия-1	Отрицательные на тип А/О/Азия-1	Всего	Превалентность для типа А/О/Азия-1
вакцинированные против ящура типа А/О/Азия-1	802/850/803	156/108/155	958/958/958	0,328/0,343/0,451
невакцинированные	19/28/28	1942/1808/1140	1961/1836/1168	
всего	821/878/831	2098/1916/1295	2919/2794/2126	

здоровых животных из регионов, свободных от ящура, где не применяется профилактическая вакцинация. Сведения о количестве положительных и отрицательных образцов и результатах их исследования в ИФА для типов ящура А, О и Азия-1 отражены в табл. 6.

Результаты расчётов диагностических характеристик для данной выборки испытуемых образцов сыворотки приведены в табл. 7, в скобках указан доверительный интервал.

Высокий уровень значений k для реакций на все 3 типа ящура (более 0,81) свидетельствовал о хорошей согласованности результатов исследований с диагностическим статусом образцов, а значения PPV и NPV, лежащие в диапазоне 0,881–0,977, — о достоверности результатов исследований.

Однако для другой выборки проб (n=46282), в которую входили нестандартизованные полевые пробы сыворотки крови, отобранные от животных разного возраста в разные сроки до и после вакцинации, чув-

ствительность и точность были ниже и составили 59,4 и 61% для типа А, для типа О — 58,2 и 59,7%, для типа Азия-1 — 60 и 60,9% соответственно. Это можно объяснить неоднородностью выборки проб для исследования и наличием целого ряда внешних факторов, влияющих на эффективность вакцинации.

Относительные чувствительность (RSe), специфичность (RSp) и точность (RAc) определяли при параллельном тестировании разных выборок проб сыворотки крови КРС в валидируемой тест-системе ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и с использованием коммерческих диагностических наборов.

Результаты сравнения тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» с коммерческими наборами на основе ИФА представлены в табл. 8. В целом валидируемая тест-система ИФА демонстрировала значительную согласованность с референтными иммуноферментными диагностическими наборами, k-критерий находился в интервале 0,632–0,782, и лишь при сравнении с наборами IZSLER для типов О и Азия-1 значения k составляли 0,561 и 0,398 соответственно, т.е. согласованность результатов исследований была выражена в умеренной и слабой степени.

Таблица 7
Диагностические характеристики тест-системы на основе ИФА

Диагностические характеристики	Тип ящура		
	А	О	Азия-1
DSe	83,7% (82,7–84,5%)	88,7% (87,7–89,6%)	83,8% (82,7–84,8%)
DSp	99% (98,6–99,4%)	98,5% (97,9–99,0%)	97,6% (96,7–98,4%)
DAc	94%	95,1%	91,4%
k-критерий	0,859 (0,843–0,871)	0,89 (0,873–0,904)	0,825 (0,803–0,841)
PPV	0,977 (0,965–0,986)	0,969 (0,956–0,978)	0,967 (0,953–0,977)
NPV	0,926 (0,921–0,929)	0,944 (0,938–0,948)	0,881 (0,872–0,887)

Таблица 8
Сравнение диагностической тест-системы ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ» с референтными наборами на основе ИФА

Относительные характеристики ИФА, ФГБУ «ВНИИЗЖ»	ЖБС ИФА, Пирбрайт			сИФА, IZSLER			сИФА, PrioCHECK		
	Тип А	Тип О	Тип Азия-1	Тип А	Тип О	Тип Азия-1	Тип А	Тип О	Тип Азия-1
RSe	98,5%	100%	100%	87,8%	70,0%	67,0%	81,8%	68,5%	81,3%
RSp	79,1%	78,9%	65,2%	91,1%	90,2%	96,0%	100%	97,5%	100%
RAc	86,2%	85,3%	88%	89,2%	77,7%	72,2%	89,0%	81,1%	87,5%
k-критерий	0,719	0,694	0,71	0,782	0,561	0,398	0,78	0,632	0,742
PPV	0,731	0,673	0,846	0,927	0,920	0,988	0,93	0,974	0,994
NPV	0,99	0,987	0,978	0,854	0,652	0,386	0,782	0,703	0,724

При сравнении результатов параллельного тестирования образцов сыворотки крови КРС в реакциях ИФА и микронейтрализации наблюдали хорошую согласованность: k-критерий, определённый для типа О, продемонстрировал высокую степень согласованности и значительную степень — для типов А и Азия-1 (табл. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённой валидации диагностической тест-системы на основе жидкофазного блокирующего «сэндвич»-варианта ИФА в соответствии с «Инструкцией по применению набора для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе» показано, что данная методика исследований на ящур была воспроизводимой не только в пределах одной лаборатории, но и при проведении межлабораторных сравнительных испытаний в рамках ФГБУ «ВНИИЗЖ». Воспроизводимость и промежуточная прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости результатов не выходили за рамки допустимых значений CV ($\leq 20\%$). Значения диагностических показателей: чувствительности — $>83\%$, специфичности — $>97\%$, точности — $>91\%$, высокий уровень значений k для реакций на все 3 типа ящура ($>0,81$) свидетельствовали о хорошей согласованности результатов исследований с диагностическим статусом образцов, а значения PPV и NPV, лежащие в диапазоне 0,881–0,977, — о достоверности результатов исследований. Также валидируемая тест-система демонстрировала согласованность с реакцией микронейтрализации: k-критерий, определённый для типа О, показал высокую степень согласованности и значительную — для типов А и Азия-1. По основным характеристикам тест-система ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ» не уступала референтным иммуноферментным диагностическим наборам и проявляла значительную степень согласованности результатов. Подтверждённый позитивно-негативный порог в 50% свидетельствовал о стабильности и стандартности реакции ИФА. Таким образом, результаты валидации методики постановки ИФА удовлетворяли критериям приемлемости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы эпидемиологии и биостатистики. — Владимир, 2004. — 460 с.
2. Использование принципов аналитической эпизоотологии в ветеринарной практике / А.К. Караулов, С.А. Дудников, К.П. Николаева, В.М. Гуленкин // Тр. фе-

дерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2005. — Т. 3. — С. 73–84.

3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М: Высшая школа, 1990. — 352 с.

4. Статистические методы анализа в клинической практике / П.О. Румянцев, В.А. Саенко, У.В. Румянцева, С.Ю. Чекин. — URL: <http://www.kantiana.ru/medicinal/help/StatMethodsInClinics.pdf>.

5. Jacobson R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases // Rev. Sci. Tech. OIE. — 1998. — Vol. 17, № 2. — P. 469–486.

6. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 1.1.5. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf.

7. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Validation Guidelines 3.6.1. Development and optimisation of antibody detection assay. — Paris, France, 2014. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf.

8. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf.

9. Vallat B. OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. — 2nd ed. — Paris, France, 2008. — 67 p.

Таблица 9
Сравнение диагностической тест-системы ИФА с реакцией микронейтрализации

Относительные характеристики ИФА	PMH		
	Тип А	Тип О	Тип Азия-1
RSe	94,3% (92,2–96,0%)	90,7% (89,2–91,7%)	96,7% (95,2–98,0%)
RSp	80,3% (76,2–83,7%)	96,7% (94,3–98,3%)	66,7% (58,1–73,3%)
RAc	89,5%	93,0%	91,9%
k-критерий	0,761 (0,697–0,813)	0,855 (0,817–0,880)	0,684 (0,569–0,782)
PPV	0,903 (0,883–0,920)	0,978 (0,962–0,987)	0,939 (0,924–0,951)
NPV	0,879 (0,833–0,915)	0,867 (0,845–0,881)	0,794 (0,692–0,873)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИЗОТОЛОГИЯ ЯЩУРА В РОССИИ (ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА)

А.В. Щербakov

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

РЕЗЮМЕ

В статье обобщены результаты 20-летних молекулярно-эпизоотологических исследований ящура в России. Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура доказывает, что все вспышки ящура в Российской Федерации в 1995–2014 гг. были вызваны заносом болезни из других стран, главным образом из Китая. Показано, что в разные годы происходил занос в Россию разных генетических линий/штаммов вируса ящура: 1995 г. — O/CATHAY, 2000 и 2004 гг. — O/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 гг. — Asia1, 2010–2011 гг. — O/SEA/Mea-98, 2012 г. — O/ME-SA/PanAsia, 2013 г. — A/ASIA/Iran-05 и A/ASIA/Sea-97, 2014 г. — A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/PanAsia и O/SEA/Mea-98. Большинство вспышек, зарегистрированных в Забайкалье и на Дальнем Востоке Российской Федерации, представляли собой продолжение панзоотий ящура, имеющих один и тот же путь распространения: из стран Юго-Восточной Азии в Китай и далее в Россию.

Ключевые слова: вирус ящура, филогенетический анализ.

FMD MOLECULAR EPIZOOTOLOGY IN RUSSIA (PHYLOGENETIC ANALYSIS OF RUSSIAN FMDV ISOLATES)

A.V. Scherbakov

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

SUMMARY

The paper sums up the results of 20-year-long FMD molecular and epizootological studies in Russia. Phylogenetic analyses of the Russian FMDV isolates are indicative of the fact that all FMD outbreaks in the Russian Federation in 1995–2014 were due to the virus introduction from other countries, mainly from China. It was demonstrated that in different years FMDV of different genetic lineages/strains was introduced into Russia, i.e. 1995 – O/CATHAY, 2000 and 2004 – O/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 – Asia1, 2010–2011 – O/SEA/Mea-98, 2012 – O/ME-SA/PanAsia, 2013 – A/ASIA/Iran-05 and A/ASIA/Sea-97, 2014 – A/ASIA/Sea-97, O/ME-SA/PanAsia and O/SEA/Mea-98. The majority of the outbreaks reported in the Zabaikalsky Krai and Far East of the Russian Federation were associated with FMD panzootics having the same route of spread: from Southeast Asian countries to China and hereafter to Russia.

Key words: foot and mouth disease virus (FMDV), phylogenetic analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур — высококонтагиозная вирусная болезнь домашних и диких парнокопытных животных. Относится к категории трансграничных болезней, способных преодолевать границы между государствами, вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса ящура (ВЯ): О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2 и SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов.

В настоящее время в мире существует семь экосистем (пулов) ВЯ: 1 — Юго-Восточная Азия и Китай, 2 — Южная Азия, 3 — Ближний и Средний Восток, 4 — Западная и Центральная Африка, 5 — Восточная Африка, 6 — Южная Африка и 7 — Южная Америка [18]. В каждом пуле циркулируют штаммы ВЯ, отличающиеся по генетическим и антигенным свойствам. Эти устойчивые генетические группы получили название топотипов (географических типов) [13, 17]. В пределах каждого топотипа различают многочисленные генетические линии ВЯ.

В России ящур не эндемичен, однако существует постоянная угроза заноса этой болезни из соседних азиатских стран. Вспышки ящура, вызванные заносом инфекции извне, регистрировались в современной России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2014 гг. [1, 2, 4, 5, 19, 20].

Для определения происхождения вирусов, ответственных за вспышки ящура, используется технология, предполагающая секвенирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP1. Впервые данный подход в исследованиях ящура применили в 1987 г. E. Beck и K. Strohmaier [9]. В РФ филогенетический анализ применяется в эпизоотологических исследованиях ящура с начала 90-х гг. прошлого века [14]. Филогенетические исследования позволяют не только устанавливать происхождение ВЯ, вызвавшего вспышку болезни, но и отслеживать пути распространения эпизоотий, а также изучать процесс эволюции и смены штаммов/генетических линий в регионах, где вирус ящура эндемичен.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы обобщить результаты многолетних молекулярно-эпизоотологических исследований ящура в России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Патологический материал. Для исследований использовали пораженный ящуром эпителий от крупного и мелкого рогатого скота и свиней. Патматериал поступил в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 1995–2014 гг. из различных регионов РФ.

Выделение РНК. РНК выделяли из 10%-й суспензии эпителия методом аффинной сорбции на стекловолоконных фильтрах, как описано ранее [7].

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Амплификацию гена VP1 проводили методом ОТ-ПЦР в соответствии с «Методическими указаниями по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1» [3].

Секвенирование. В 1995–2006 гг. секвенирование ПЦР-продуктов проводили с использованием набора fmol DNA Cycle Sequencing System (Promega, США) в со-

ответствии с рекомендациями фирмы-производителя. В качестве метки применяли [α - 32 P]-дезоксиденозин-5'-трифосфат производства фирмы «Изотоп» (г. Обнинск). С 2007 г. секвенирование осуществляли с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit и автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ BioEdit. Для графического построения дендрограмм применяли программу MEGA 6, Neighbor-Joining method, 1000 bootstrap replications.

РЕЗУЛЬТАТЫ

За последние 20 лет вспышки ящура регистрировались в России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2014 гг. Задача исследований состояла в том, чтобы определить происхождение эпизоотических изолятов ВЯ, вызвавших эти вспышки.

В 1995 г. ящур типа О был зарегистрирован у свиней в хозяйстве «Петровское» Люберецкого района Московской области. Филогенетический анализ показал, что вирус, вызвавший эту вспышку, принадлежит к топотипу Cathay (Китай) (рис. 1). Этот топотип эндемичен в КНР и имеет уникальную биологическую особенность: в отличие от всех других топотипов ВЯ он поражает только свиней и не способен вызывать клиническое заболевание у крупного и мелкого рогатого скота [8]. Полученная в результате филогенетического анализа информация о китайском происхождении подмосковного изолята позволила оперативно установить источник инфекции: им оказалась свинина, которую импортировал из КНР подмосковный мясокомбинат, расположенный в непосредственной близости от хозяйства «Петровское».

В 2000 г. вспышка ящура типа О была зарегистрирована в Приморском крае РФ. Филогенетические исследования показали, что вирус, ответственный за эту вспышку, принадлежит к генетической линии PanAsia (ПанАзия). Эта генетическая линия впервые была зарегистрирована в Индии в 1990 г. В 1998 г. вирус вышел за пределы этой страны, и его распространение приобрело характер панзоотии. К 2000 г. паназиатский штамм вызвал вспышки ящура практически во всех азиатских странах, в том числе в Монголии, Южной Корее и Японии, где болезнь регистрировалась до этого в 1973, 1934 и 1908 гг. соответственно [11]. В связи с тем, что панзоотия, обусловленная этим вирусом, охватила весь Азиатский континент, штамм и получил название «ПанАзия». В 2001 г. паназиатский штамм был занесен в Западную Европу и вызвал опустошительную эпизоотию в Великобритании. В Приморском крае РФ до 2000 г. ящур регистрировался последний раз в 1964 г. Из всех изолятов вируса ящура, чьи нуклеотидные последовательности представлены в международной базе данных GenBank, генетически наиболее близким приморскому изоляту 2000 г. является китайский изолят O/CHN/2/99 (AJ318831). Это подтверждает, что ящур в Россию был занесен с территории КНР. Таким образом, вспышку ящура в России в 2000 г. можно рассматривать как составную часть панзоотии, обусловленной паназиатским штаммом ВЯ и охватившей весь Азиатский континент.

Вспышка ящура в Амурской области в 2004 г. также была вызвана паназиатским штаммом ВЯ типа О. Поиск ближайших родственников в GenBank показал, что

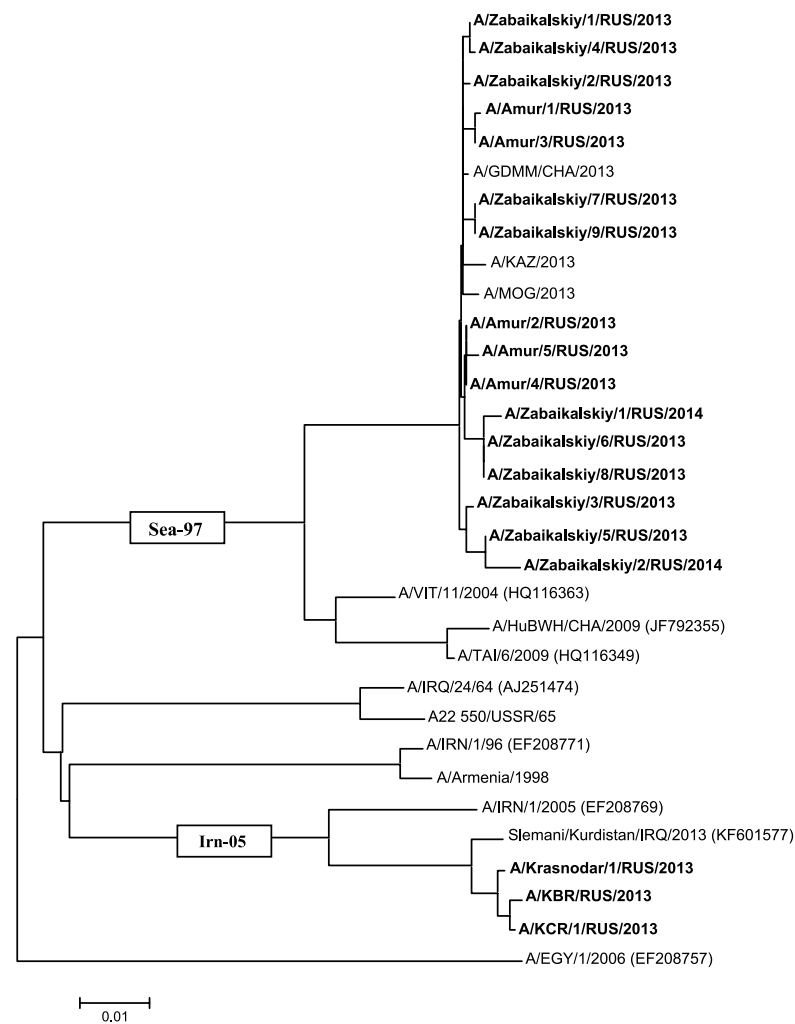


Рис. 3. Положение российских изолятов на филогенетическом древе ВЯ типа А. Дендрограмма основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP1

линия эндемична в странах Юго-Восточной Азии: Вьетнаме, Таиланде, Малайзии и др. Из сообщений Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [19] и Всемирной референтной лаборатории по ящуру (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания) [20] известно, что в 2013 г. этот вирус вышел за пределы своего естественного ареала и был занесен в Китай. Сравнение, проведенное с использованием банка нуклеотидных последовательностей WRL-FMD, показало, что российские изоляты из Забайкалья и Амурской области имеют максимальное генетическое родство (до 99,65%) именно с китайскими изолятами 2013 г. [20]. Это доказывает, что занос ящура в Забайкальский край и Амурскую область РФ произошел с территории Китая. Помимо России вспышки ящура, обусловленные ВЯ А/Sea-97, были зарегистрированы в 2013 г. в Восточном Казахстане и Монголии. Очевидно, что и в эти страны ящур был занесен из Китая. В 2014 г. ВЯ А/Sea-97 вызвал еще три вспышки в России — все в Забайкальском крае.

В 2014 г. помимо типа А в РФ были зарегистрированы вспышки ящура типа О. Вирус, вызвавший вспышку в с. Староцурухайтуй Приаргунского района Забайкальского края, принадлежал к генетической линии

О-PanAsia. Многочисленные очаги ящура в Спасском районе Приморского края были обусловлены вирусом О/SEA/Mea-98 (рис. 1). Таким образом, в 2014 г. в Россию из КНР были занесены два разных топотипа ВЯ типа О.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных филогенетических исследований доказывают, что все вспышки ящура в России в период 1995–2014 гг. были вызваны заносом болезни из соседних азиатских стран, главным образом из Китая. Заносом ящура из КНР была обусловлена вспышка болезни в Московской области в 1995 г., а также все вспышки (за возможным единичным исключением) в Забайкалье и на Дальнем Востоке России в период 2000–2014 гг. Запрет на ввоз мясopодуктов из Китая, действовавший в период 2004–2014 гг., позволил защитить от ящура большинство регионов РФ, однако он оказался не способен предотвратить занос болезни на территории, непосредственно граничащие с КНР. Это может объясняться разными причинами: аэрогенным, водным и механическим путями передачи ящура, а также возможным нелегальным ввозом инфицированной животноводческой продукции из Китая в приграничные районы РФ.

Примечательно, что до 2000 г. Забайкалье и Дальний Восток России, так же как Япония, Корея и Монголия, были стабильно благополучны по ящуру на протяжении многих десятилетий. Кардинальное изменение ситуации по ящуру, произошедшее в этом регионе Азии на рубеже веков, вероятно, объясняется несколькими факторами.

Первый фактор природный. Он заключается в том, что в XX столетии в Китае был эндемичен только топотип Cathay (китайский) ВЯ типа О. Этот топотип имеет уникальную особенность. Он способен поражать только свиней и, в отличие от всех других топотипов вируса ящура, не вызывает клинического заболевания у рогатого скота [8]. В связи с этим способность к панзоотическому распространению китайского топотипа ВЯ невысока, и он не представлял большой опасности для стран — северных соседей КНР.

Второй фактор, определявший благополучие стран Дальнего Востока по ящуру в XX веке, связан с уровнем социально-экономического развития Китая. Большую часть века экономически слаборазвитый Китай был своеобразным буфером, отделявшим Россию, Монголию, Корею и Японию от Юго-Восточной Азии, где эндемичен ящур трех типов: А, О и Азия-1. Все потенциальные панзоотии ящура, начинавшиеся в Юго-Восточной Азии, гасли на огромных просторах Китая из-за слабого развития внутренних и внешних торговых связей.

Однако к концу XX века ситуация принципиально изменилась. Быстрый экономический рост КНР привел к расширению социальных и торговых связей, как внутренних, так и внешних. В результате этого ящур из стран Юго-Восточной Азии стал чаще проникать в Китай и при этом получает широкое распространение, достигая северных территорий страны. Из барьера на пути этого заболевания Китай превратился в мост, по которому ящур из Юго-Восточной Азии начал достигать ранее благополучных по этой болезни Кореи, Японии, Монголии и России.

Как результат, за последние 15 лет в Восточной Азии имело место несколько панзоотий ящура. Они

были вызваны разными серотипами и генетическими линиями ВЯ: 1999–2000 гг. — О/ME-SA/PanAsia, 2005–2006 гг. — Asia1, 2010 г. — О/SEA/Mya-98, 2012–2014 гг. — О/ME-SA/PanAsia, 2013 г. — А/Sea-97.

Все эти панзоотии, за исключением одной, обусловленной ВЯ типа Азия-1, имели сходные пути распространения: из Юго-Восточной Азии в Китай и далее из Китая в Россию, Монголию, Южную Корею и Японию. Это дает определенные основания для прогноза. Поскольку в странах Юго-Восточной Азии ящур типов О, А и Азия-1 в обозримом будущем будет оставаться эндемичным, ситуация по этому заболеванию в Забайкалье и на Дальнем Востоке России, а также в Монголии, Корею и Японию в значительной степени будет зависеть от способности Китая предотвращать проникновение на свою территорию ящура из Юго-Восточной Азии или, по крайней мере, сдерживать его распространение по стране. Опыт последних лет свидетельствует о том, что Китай пока не способен справиться с этой задачей. В этой ситуации Россия должна быть готова к возможному повторению панзоотий ящура в Восточной Азии.

Особую тревогу вызывает тот факт, что генетические линии ВЯ, занесенные в последние годы из стран Юго-Восточной Азии в Китай, «укореняются», приобретают энзоотический характер на территории КНР. Так, генетические линии О/SEA/Mya-98 и О/ME-SA/PanAsia циркулируют в Китае с 2010 и 2011 гг. соответственно. Это создает риск заноса ящура из КНР в Россию и в отсутствие панзоотий в Восточной Азии.

Как было отмечено выше, панзоотия ящура типа Азия-1, охватившая Восточную Азию в 2005–2006 гг., принципиально отличалась от остальных. Она началась не в Юго-Восточной Азии, а непосредственно в Китае. Учитывая, что серотип Азия-1 ВЯ в КНР не эндемичен, представляет интерес установление источника вспышек в Китае. Филогенетические исследования, проведенные во Всемирной референтной лаборатории по ящуру (Пирбрайт, Великобритания), показали, что китайские изоляты на 98–99% идентичны вирусу, выделенному в Индии еще в 1980–1981 гг. [20]. Этот факт очень необычен. ВЯ обладает очень высокой скоростью мутационной изменчивости, и вероятность его сохранения в естественных условиях в течение 25 лет практически в неизменном состоянии исключена. Однако чрезвычайно близкое родство вирусов 2005 г. и 1980–1981 гг. можно объяснить, если предположить, что в Китае использовалась вакцина против ящура типа Азия-1, изготовленная на основе одного из индийских штаммов.

По-видимому, ситуацию с распространением ящура типа Азия-1 в Восточной Азии можно представить следующим образом. В Китае ВЯ типа Азия-1 не эндемичен. Однако, учитывая возможность заноса этого типа ящура из соседних стран Юго-Восточной Азии и Индии, в КНР в 80-е гг. могла быть разработана вакцина против этого типа. Поскольку «родных» китайских штаммов ВЯ типа Азия-1 нет, вакцина была изготовлена на основе индийских штаммов. Вероятно, эта вакцина хранилась в резерве (банке вакцин) с 80-х гг. и ждала своего часа. Час настал в марте 2005 г. и был связан с возникновением вспышки ящура типа Азия-1 в Гонконге, вызванной заносом инфекции из Центральной Азии (изолят As1/HKN/1/2005 на рис. 2). Обеспокоенные возможностью распространения по стране этого заболевания, власти КНР, вероятно, ини-

цировали кампанию по массовой вакцинации скота против ящура данного типа. Поскольку постоянно вакцина против ящура типа Азия-1 в Китае на тот момент не производилась, она — вся или какая-то часть ее — была взята из резерва. В этом случае вакцина вполне могла стать источником инфекции. Дело в том, что в 80-е гг. при производстве вакцин ВЯ инактивировали формалином. Вакцины, изготовленные по этой технологии, могут содержать не полностью инактивированный вирус и таким образом вызывать поствакцинальный ящур. Так, E. Beck и K. Strohmaier показали, что большинство эпизоотий и отдельных вспышек ящура в Западной Европе в период 1964–1984 гг. имели поствакцинальное происхождение [9].

На поствакцинальный характер эпизоотии ящура типа Азия-1 в Китае в 2005 г. указывают и особенности ее распространения. Многочисленные вспышки ящура начали регистрироваться практически одновременно (в апреле–мае 2005 г.) в различных провинциях КНР [19], что невозможно при естественном распространении болезни, однако вполне объясняется проведением повсеместной вакцинации. Китаю потребовалось несколько лет, чтобы ликвидировать катастрофические последствия этой вакцинации: ящур типа Азия-1 удалось ликвидировать лишь в 2009 г.

Таким образом, помимо природно-географических факторов (соседство с Юго-Восточной Азией) на ситуацию по ящуру в Китае влиял и так называемый человеческий фактор, связанный с ошибками в борьбе с болезнью. Можно предполагать, что в ближайшем будущем Китай останется основным «поставщиком» ящура в Россию.

Что касается ситуации по ящуру на Северном Кавказе РФ, то она в будущем будет зависеть от многих факторов: степени распространения ящура в странах Закавказья, интенсивности экономических и социальных связей населения в приграничных регионах и др. Важным условием обеспечения благополучия по ящуру на Северном Кавказе является также эффективность противоящурной вакцинации в буферной зоне.

В последние годы значительно возросли риски заноса ящура в Россию из Казахстана. До 2011 г. ящур проникал на территорию этой страны исключительно с юга, через Кыргызстан. Южные области Казахстана были неблагополучны по ящуру, однако от них Россию отделяли обширные территории Центрального и Северного Казахстана. Начиная с 2011 г. появился еще один путь заноса ящура в Казахстан — восточный, из Китая. Для России опасность этого пути заключается в том, что в этом случае ящур заносится в Восточный Казахстан, т.е. на территории, непосредственно граничащие с нашей страной. Таким образом, риски заноса ящура в РФ из соседних азиатских стран имеют тенденцию к росту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Молекулярная эпизоотология ящура в России и странах СНГ / А.В. Щербаков, В.Г. Андреев, В.В. Дрыгин, А.А. Гусев // *Аграрная Россия*. — 2002 — № 2. — С. 8–11.
- Филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура / А.В. Щербаков, А.М. Тимина, А.С. Яковлева, В.В. Дрыгин, В.М. Захаров // *Тр. Федерального центра охраны здоровья животных*. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 20–25.

3. Щербаков А.В., Перевозчикова Н.А., Дрыгин В.В. Методические указания по индикации генома и штаммовой дифференциации вируса ящура методом полимеразной цепной реакции и секвенированием гена VP1 // Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. — Владимир, 1998. — С. 31–41.

4. Щербаков А.В., Тимина А.М. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России и Монголии в 2010 г. // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2011. — Т. 9. — С. 5–11.

5. Щербаков А.В., Тимина А.М., Зиняков Н.Г. Филогенетический анализ изолятов вируса ящура, вызвавших вспышки болезни в России в 2013 году // Ветеринария. — 2014. — № 7. — С. 22–25.

6. Эпизоотическая ситуация по ящуру типа Азия-1 в России в 2005 году и анализ эффективности мер борьбы / К.Н. Груздев, Т.З. Байбиков, В.Н. Герасимов [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 3–19.

7. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis / A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev // The Veterinary Quarterly. — 1998. — Vol. 20, № 2. — P. 32–34.

8. Beard C.W., Mason P.W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus // J. Virol. — 2000 — Vol. 74, № 2. — P. 987–991.

9. Beck E., Strohmaier K. Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination // J. Virol. — 1987. — Vol. 61. — P. 1621–1629.

10. Comparative sequence analysis of representative foot-and-mouth disease virus genomes from Southeast Asia / N.F. Abdul-Hamid, M. Firat-Saraç,

A.D. Radford [et al.] // Virus Genes. — 2011. — Vol. 43, № 1. — P. 41–45.

11. Emergence of a pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O / N.J. Knowles, A.R. Samuel, P.R. Davies [et al.] // European Commission for the control of FMD. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee Borovets, Bulgaria, 5–8 September, 2000. — P. 20–31.

12. Genetic basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease serotype A viruses from the Middle East / S. Upadhyaya, G. Ayelet, G. Paul [et al.] // Vaccine. — 2014. — Vol. 32, № 5. — P. 631–638.

13. Knowles N.J., Samuel A.R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus // Virus Res. — 2003. — Vol. 91, № 1. — P. 65–80.

14. Preliminary molecular analysis of FMD virus isolates collected on territories of Russia and the CIS in 1993–1994 / V.V. Drygin, A.V. Scherbakov, N.A. Perevozchikova, A.A. Gusev // Europ. Commis. FMD. Vienna. Austria, 19–22 September 1994. — Rome, 1994. — P. 8.

15. Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus type A in the Middle East / N.J. Knowles, M.H. Nazem Shirazi, J. Wadsworth [et al.] // Transbound Emerg Dis. — 2009. — Vol. 56, № 5. — P. 157–169.

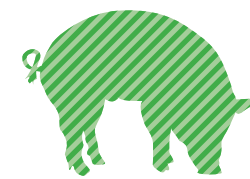
16. Recent spread of FMD virus serotype Asia 1 / J.F. Valarcher, N.J. Knowles, N.P. Ferris [et al.] // Vet. Record. — 2005. — July 2. — P. 30.

17. Samuel A.R., Knowles N.J. / Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes) // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82, № 3. — P. 609–621.

18. <http://www.foot-and-mouth.org>.

19. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation.

20. http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping.



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ p30, pK205R И pB602L В СЕРОДИАГНОСТИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

М.Р. Якупов¹, А.С. Яковлева², А.В. Щербаков³

¹ ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mapat.89@mail.ru

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

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

РЕЗЮМЕ

Экспрессией в *E. coli* получены рекомбинантные белки p30, pK205R и pB602L вируса африканской чумы свиней. На основе рекомбинантных антигенов разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для обнаружения антител к вирусу африканской чумы свиней. Диагностическая специфичность тест-систем pK205R- и pB602L-ИФА составляла 99,8%, p30-ИФА — 99,5%. На референтной панели положительных сывороток диагностическая чувствительность составляла 100% для p30-ИФА и pK205R-ИФА и 94,12% — для pB602L-ИФА. При исследовании сывороток от экспериментально и естественно инфицированных животных p30-ИФА и pK205R-ИФА превосходили по чувствительности коммерческие тест-системы и были сравнимы с иммуноферментным анализом, который Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует для серодиагностики африканской чумы свиней. Международные слепительные испытания по диагностике африканской чумы свиней подтвердили высокую специфичность и чувствительность тест-систем p30-ИФА и pK205R-ИФА.

Ключевые слова: африканская чума свиней, иммуноферментный анализ, рекомбинантные белки, антитела.

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 России. Экономический ущерб, наносимый АЧС, складывается из прямых потерь по радикальной ликвидации болезни, ограничений в международной торговле и измеряется сотнями миллионов долларов.

Возбудитель АЧС — крупный оболочечный вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Геном вируса АЧС, представленный двухцепочечной ДНК длиной 170–192 тысячи пар нуклеотидов, кодирует до 150 белков, из них не менее 28 являются структурными [1].

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 на 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 к вирусу АЧС является основным способом выявления животных, инфицированных низковирулентными штаммами [3].

В качестве основного метода серологической диагностики АЧС Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) рекомендует иммуноферментный анализ (ИФА), где в качестве антигена используются частично очищенные препараты белков вируса АЧС, выращенного в культуре клеток MS (далее МЭБ-ИФА) [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, которые биологически безопасны,

более технологичны в приготовлении и обеспечивают более высокую специфичность ИФА. К настоящему времени описано применение в серодиагностике АЧС нескольких рекомбинантных белков: р54 [7, 8], р30 [9, 12], рр62 [5], р10, р72, рА104R, рС44L, рСР312R [13], рК205R и рВ602L [10].

Цель данной работы состояла в том, чтобы экспрессией в *E. coli* получить рекомбинантные белки р30, рК205R и рВ602L, разработать на их основе непрямой вариант ИФА и сравнить р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА между собой и с коммерческими тест-системами для серодиагностики АЧС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. Как источник ДНК вируса АЧС использовали российский изолят «Оренбург-2008».

Выделение вирусной ДНК осуществляли методом аффинной сорбции на стекловолокнистых фильтрах.

ПЦР. Для проведения ПЦР собирали реакционную смесь, которая содержала 5 мкл 10× буфера для ПЦР, 3 мМ Mg²⁺, 0,2 мМ dNTPs, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 10 пмоль праймеров, 5 мкл раствора ДНК и воду до 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 2,0% агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА.

Молекулярное клонирование ампликонов осуществляли по общепринятым методикам [1].

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

Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной хроматографии, используя в качестве сорбента His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma, США).

Сыворотки крови свиней. Референтные сыворотки, содержащие антитела к вирусу АЧС, были получены из референтной лаборатории Европейского союза по АЧС (ASF-URL, CISA-INIA, Мадрид, Испания). Положительную референтную сыворотку (код в каталоге — ASF-CP) применяли в качестве положительного контроля в ИФА. Референтную панель сывороток (код в каталоге — ASF-Ref-1) использовали для оценки диагностической чувствительности ИФА.

Сыворотки от свиньи, экспериментально инфицированной полевым российским изолятом вируса АЧС, выделенным в ходе вспышки АЧС в Псковской области в 2014 г., были предоставлены сотрудниками референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ». Свинья вышла после заражения изолятом «Антоново 07/14» и на 32 сут. после первого инфицирования была заражена вирусом АЧС повторно.

Полевые сыворотки от естественно инфицированных вирусом АЧС домашних свиней были получены из ООО «ПХ «Лазаревское» Тульской области, где в январе 2014 г. была зарегистрирована вспышка АЧС.

Для определения диагностической специфичности ИФА в качестве заведомо отрицательных применяли сыворотки крови от племенных свиней, ввезенных в РФ из стран Европейского союза, свободных от АЧС.

ИФА. Разработка ИФА на основе рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L являлась предметом исследований, условия проведения анализа описаны в разделе «Результаты и обсуждение».

ИФА с коммерческим набором INGENASA INGEZIM RPA COMPAC (Ingenasa, Испания) проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Статистическая обработка данных. Диагностическую чувствительность и специфичность ИФА вычисляли по формулам, рекомендованным МЭБ:

$$D_{\text{чув}} = (\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})) \times 100\%;$$

$$D_{\text{спец}} = (\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})) \times 100\%,$$

где ИП — истинно положительный результат;

ЛО — ложноотрицательный результат;

ИО — истинно отрицательный результат;

ЛП — ложноположительный результат [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных белков. Гены СР204L, К205R и В602L 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.

В результате трансформации рекомбинантными плазмидами компетентных клеток JM109 *E. coli* получили клоны, экспрессирующие рекомбинантные белки р30, рК205R и рВ602L вируса АЧС. Молекулярный вес рекомбинантных белков соответствовал расчетному (рис. 1).

С целью повышения выхода рекомбинантных белков проведены эксперименты по оптимизации условий экспрессии и очистки. В результате оптимизации всех параметров удалось получить очищенные препараты

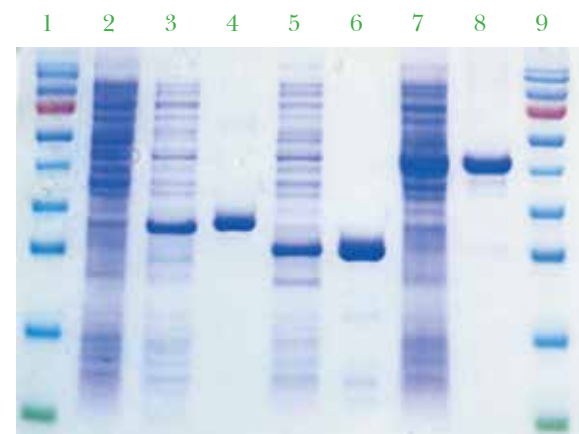


Рис. 1. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков р30, К205R и рВ602L вируса АЧС, анализ в 12% ПААГе. 1 и 9 — маркер молекулярной массы белков (Fermentas); 2 — лизат нерекомбинантного штамма *E. coli* (отрицательный контроль); 3, 5 и 7 — экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L соответственно; 4, 6 и 8 — очищенные препараты рекомбинантных белков р30, рК205R и рВ602L соответственно

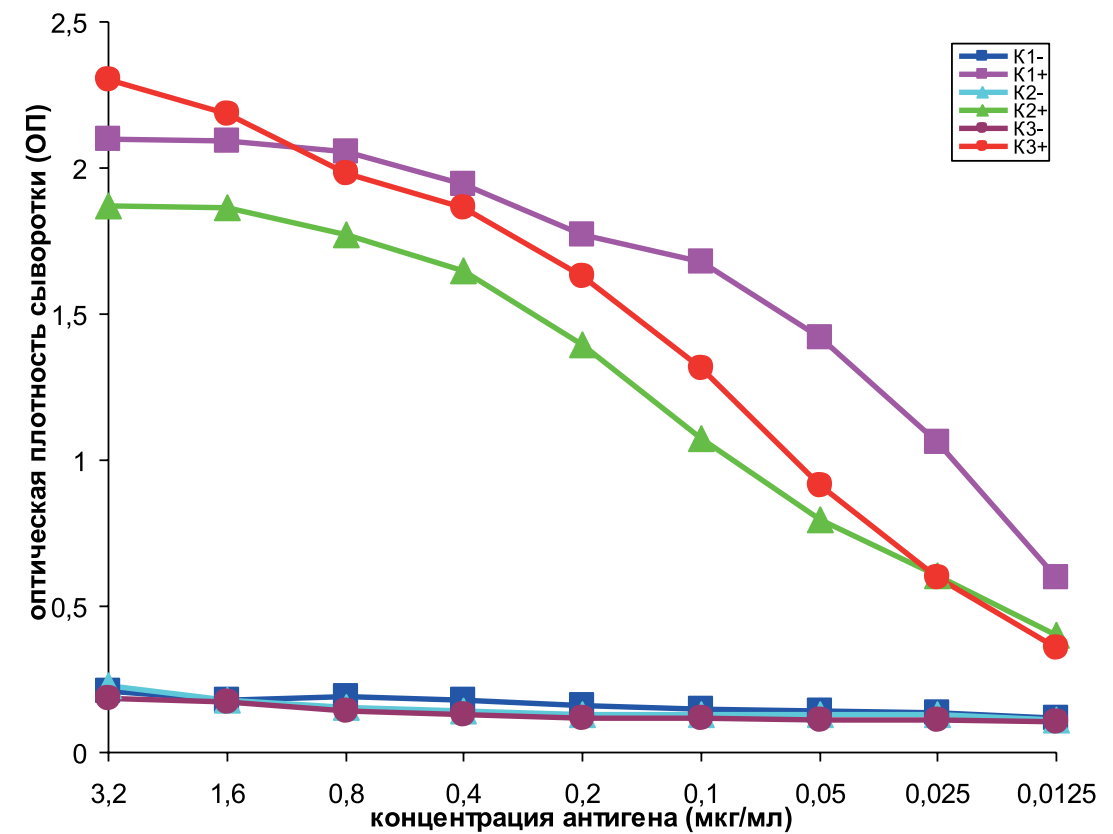


Рис. 2. Антигенная активность рекомбинантных белков рК205R (K1), рВ602L (K2) и р30 (K3) вируса АЧС в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками крови свиней

рекомбинантных белков с высокой концентрацией. Выход очищенного протеина со 100 мл культуры *E. coli* составил 1,75 мг для р30, 1,5 мг — для рК205R и 2 мг — для рВ602L.

Антигенную активность рекомбинантных белков проверяли в непрямом варианте ИФА с контрольными сыворотками свиней, взятыми в разведении 1:20. Зависимость средней оптической плотности контрольных сывороток от концентрации рекомбинантных антигенов представлена на рис. 2. Все три белка обладали выраженной антигенной активностью.

Разработка р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА. На основе рекомбинантных антигенов р30, рК205R и рВ602L разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней. В процессе работы определены оптимальные условия реакции: рабочая концентрация антигенов, разведение сывороток и конъюгата, состав блокирующего раствора, температурно-временной режим для каждого этапа ИФА. Также были определены допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток, позитивно-негативный порог и воспроизводимость результатов ИФА.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема постановки непрямого варианта ИФА. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рекомбинантного белка в рабочем разведении в 0,05M карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали 16–18 ч при +4 °С. Затем планшеты отмывали 3 раза буфером PBST (на 1 л раствора: NaCl — 8,0 г; KCl — 0,2 г; Na₂HPO₄ — 2,8 г; K₂HPO₄ — 0,2 г; Tween-20 — 0,05%; рН 7,3). Лунки планшетов блокировали 3% раствором молока в PBST, внося по 100 мкл раствора в каждую из

них, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Планшеты отмывали 3-кратно раствором PBST. Тестируемые сыворотки, разведенные 1:20 в блокирующем буфере, вносили в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов, вносили конъюгат (Sigma, США) в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки вносили субстрат АВТС, через 10–15 мин останавливали реакцию добавлением 1% раствора додецилсульфата натрия и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Значения процента позитивности (ПП) исследуемых проб определяли по формуле:

$$(\text{ОП пробы} - \text{ОП К}^-) / (\text{ОП К}^+ - \text{ОП К}^-) \times 100\%,$$

где ОП пробы — оптическая плотность исследуемой сыворотки;

ОП К⁻ — оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки;

ОП К⁺ — оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Сыворотки считали отрицательными, если ПП был меньше 20%, положительными — при ПП больше или равном 25% и сомнительными при ПП больше 20%, но меньше 25%.

Определение аналитической специфичности и чувствительности ИФА. Аналитическую специфичность ИФА проверяли на сыворотках крови свиней, содержащих антитела к вирусам классической чумы свиней, репродуктивно-респираторного синдрома, цирковирусу свиней 2 типа, гриппа, болезни Ауески, парвовирусной инфекции. Все сыворотки показали отрицательный результат в рК205R-, рВ602L- и р30-ИФА.

Для проверки аналитической чувствительности ИФА приготовили серию 2-кратных разведений референтной положительной сыворотки. Предельное разведение сыворотки, в котором были выявлены анти-

Таблица 1
Результаты ИФА с референтной панелью сывороток

№ пробы	Статус пробы (сыворотки)	Изолят вируса АЧС	Тест-система		
			р30-ИФА	рК205R-ИФА	рВ602L-ИФА
1	отрицательная	-	-3,01%	-2,54%	-1,19%
2	положительная	E75/E70 (SPAIN)	115,18%	128,48%	138,47%
3	положительная	E75/E70 (SPAIN)	106,23%	51,07%	47,97%
4	положительная	Ken05.Tk1 (KENYA)	97,14%	85,39%	33,82%
5	отрицательная	-	-2,54%	-1,18%	-1,54%
6	слабоположительная	E75/E70	98,33%	45,16%	36,98%
7	положительная	E75/E70 (SPAIN)	108,75%	130,17%	135,21%
8	слабоположительная	E75/E70	86,58%	46,15%	36,58%
9	отрицательная	-	-2,94%	-1,15%	-2,38%
10	положительная	E75/E70	69,39%	63,38%	39,46%
11	положительная	E75/E70	104,71%	122,62%	103,50%
12	положительная	E75/E70	65,92%	62,93%	39,07%
13	сильноположительная	NHV/L60	96,81%	80,17%	38,80%
14	положительная	NHV/L60	83,37%	75,73%	5,29%
15	сильноположительная	NHV/L60	113,64%	94,10%	40,24%
16	сильноположительная	NHV/L60	103,00%	118,47%	76,04%
17	отрицательная	-	0,68%	1,16%	-4,92%
18	отрицательная	-	0,29%	0,97%	-6,49%
19	сильноположительная	NHV/L60	112,96%	114,51%	76,16%
20	сильноположительная	NHV/L60	100,29%	58,99%	63,78%
21	положительная	NHV/L60	107,93%	99,71%	44,08%
22	положительная	NHV/L60	71,85%	107,25%	98,86%

р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА: ПП>25% — положительный результат, ПП<20% — отрицательный результат, 20%<ПП<25% — сомнительный результат.

тела к вирусу АЧС, составляло 1:640 для рК205R-ИФА, 1:1280 для р30-ИФА и 1:320 для рВ602L-ИФА. Таким образом, самую высокую аналитическую чувствительность продемонстрировал р30-ИФА, у рВ602L-ИФА она была самой низкой.

Определение диагностической специфичности и чувствительности ИФА. Для определения диагностической специфичности ИФА тестировали 1000 заведомо отрицательных на АЧС сывороток крови от свиней, ввезенных в РФ из стран Западной Европы, свободных от АЧС. При этом в рК205R-ИФА и рВ602L-ИФА было получено по 2 ложноположительных результата, а в р30-ИФА — 5 ложноположительных результатов. Таким образом, специфичность рК205R-ИФА и рВ602L-ИФА составляла 99,8%, специфичность р30-ИФА — 99,5%.

Чувствительность ИФА проверяли с использованием референтной панели сывороток, предназначенной для валидации методов серологической диагностики АЧС. Панель была предоставлена референтной лабораторией Европейского союза по АЧС (ASF-URL, CISA-INIA, Мадрид, Испания) и включала 22 образца: 17 положительных и 5 отрицательных на АЧС. В р30- и рК205R-

ИФА антитела к вирусу АЧС были выявлены во всех положительных образцах, в рВ602L-ИФА положительная сыворотка № 14 продемонстрировала отрицательный результат (табл. 1). Следовательно, диагностическая чувствительность р30- и рК205R-ИФА на референтной панели сывороток составила 100%, а чувствительность рВ602L-ИФА — 94,12%.

Таким образом, в результате сравнительных исследований было установлено, что рВ602L-ИФА уступает рК205R-ИФА и р30-ИФА как по аналитической, так и по диагностической чувствительности. Кроме того, в процессе работы у рекомбинантного белка рВ602L выявился еще один недостаток: при хранении он довольно быстро терял антигенную активность. Из-за этой нестабильности при хранении его приходилось регулярно «перетитровать», т.е. заново определять рабочую концентрацию. В отличие от белка рВ602L, рекомбинантные антигены рК205R и р30 отличались хорошей стабильностью при хранении. Учитывая все это, из трех разработанных тестов для дальнейшей работы были отобраны два: р30-ИФА и рК205R-ИФА. Оба теста показали на референтной панели 100% чувствительность, а их специфичность превышала 99%.

Сравнение р30- и рК205R-ИФА с коммерческими наборами. Одна из задач данной работы заключалась в сравнении разработанных тест-систем с коммерче-

Таблица 2
Результаты исследования сывороток крови от свиньи, экспериментально зараженной вирусом АЧС

ДПИ	Тест-система			
	р30-ИФА	рК205R-ИФА	ВНИИВВиМ АЧС-ИФА	INGENASA
4	-3,15	-9,34	0,106	38,4
9	65,19	53,66	0,270	66,7
12	74,59	67,43	0,300	82,0
16	74,80	69,14	0,328	80,8
21	92,53	70,42	0,453	88,5
24	95,73	72,88	н.и.	87,3
40	106,41	88,36	0,6009	93,5
43	105,66	89,64	0,6107	96,8
50	115,27	80,35	н.и.	97,4
63	119,75	102,88	1,0559	100,0

р30- и рК205R-ИФА: ПП>25% — положительный результат, ПП<20% — отрицательный результат, 20%<ПП<25% — сомнительный результат; INGENASA: <40% — отрицательный результат, >40% но <50% — сомнительный результат, >50% — положительный результат; ВНИИВВиМ АЧС-ИФА: положительный контроль — 1,874, отрицательный контроль — 0,118. Пробы с ОП в 2,5 и более раз выше отрицательного контроля, т.е. более 0,295, — положительные, менее 0,295 — отрицательные; ВНИИВВиМ АЧС-ИФА для перепроверки сыворотки на 9 ДПИ в новой серии набора: положительный контроль — 1,407, отрицательный контроль — 0,10095. Пробы с ОП в 2,5 и более раз выше отрицательного контроля, т.е. более 0,252 — положительные, менее 0,252 — отрицательные; н.и. — не исследовали.

скими наборами для серодиагностики АЧС. Сравнительный анализ чувствительности тест-систем проводили с использованием сывороток крови от свиньи, экспериментально инфицированной вирусом АЧС. В р30- и рК205R-ИФА антитела к вирусу АЧС были выявлены во всех пробах, отобранных на 9–63 дни после инфицирования (ДПИ) (табл. 2). Аналогичные результаты были получены с использованием набора INGENASA INGEZIM PPA COMPAC (Ingenasa, Испания). В «Наборе для иммуоферментной диагностики африканской чумы свиней (ВНИИВВиМ АЧС-ИФА Ат/Аг)» (ГНУ ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия) в сыворотке, отобранной на 9 ДПИ, изначально антитела не обнаруживались, но при повторном исследовании набором другой серии сыворотка показала слабоположительный результат (данные, полученные с использованием этой тест-системы, предоставлены сотрудником референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» Першиным А.С.).

Исследования полевых сывороток крови. В январе 2014 г. были получены 18 проб сыворотки крови свиней из очага АЧС (ООО «ПХ «Лазаревское» Тульской области). Во всех 18 пробах методом ПЦР была обнаружена ДНК вируса АЧС. Это подтверждает, что кровь была взята от зараженных животных. Антитела к вирусу АЧС были обнаружены в 14 пробах с использованием р30-ИФА и в 13 пробах с использованием рК205R-ИФА (табл. 3). Сходные результаты (12 положительных проб) были получены в МЭБ-ИФА (результаты МЭБ-ИФА предоставлены сотрудником референтной лаборатории МЭБ по АЧС (Мадрид, Испания) Линой Мур). А вот с применением коммерческого набора INGENASA INGEZIM PPA COMPAC (Ingenasa, Испания) антитела к вирусу АЧС удалось обнаружить только в 2 пробах. Низкая

чувствительность INGENASA, а также разночтения по некоторым пробам (№№ 1, 2, 6, 11, 12 и 14) между р30-, рК205R-ИФА и МЭБ-ИФА в данном случае, очевидно, объясняются тем, что уровень антител к вирусу АЧС в полевых сыворотках был очень низким, поскольку с момента заражения животных до отбора проб прошло мало времени.

Оценка р30-ИФА и рК205R-ИФА в международных сравнительных испытаниях. В 2013 г. р30-ИФА и рК205R-ИФА были применены в международных сравнительных испытаниях по диагностике АЧС, организованных референтной лабораторией по АЧС Европейского союза (URL-CISA-INIA, Мадрид, Испания). В ходе испытаний был правильно определен инфекционный статус всех закодированных сывороток [2]. Результаты испытаний подтверждают, что разработанные тест-системы р30-ИФА и рК205R-ИФА являются чувствительными, специфичными и позволяют достоверно определять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

ВЫВОДЫ

1. На основе рекомбинантных антигенов рК205R, рВ602 и р30 разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.
2. На референтной панели положительных сывороток диагностическая чувствительность составляла 100% для р30-ИФА и рК205R-ИФА и 94,12% — для рВ602L-ИФА. Диагностическая специфичность р30-, рК205R- и рВ602L-ИФА превышала 99%.
3. При исследовании сывороток от экспериментально и естественно инфицированных животных р30-ИФА и рК205R-ИФА превосходили по чувствительности коммерческие тест-системы и были сравнимы с МЭБ-ИФА.

Таблица 3

Результаты исследований полевых сывороток из очага АЧС (ООО «ПХ «Лазаревское»)

№ сыворотки	Тест-система			
	p30-ИФА	pK205R-ИФА	INGENASA	МЭБ-ИФА
1	26,87	18,89	отр.	отр.
2	36,27	21,46 (сомн.)	отр.	пол.
3	32,28	42,93	отр.	пол.
4	45,06	51,09	пол.	пол.
5	39,91	41,95	отр.	пол.
6	23,59 (сомн.)	39,38	пол.	отр.
7	11,09	14,55	отр.	отр.
8	41,60	38,14	отр.	пол.
9	35,12	43,02	отр.	пол.
10	17,03	16,23	отр.	отр.
11	27,94	51,09	отр.	отр.
12	13,30	13,48	отр.	пол.
13	30,60	48,43	отр.	пол.
14	32,11	42,22	отр.	отр.
15	35,30	50,91	отр.	пол.
16	54,99	54,46	отр.	пол.
17	53,84	49,14	отр.	пол.
18	31,93	55,43	отр.	пол.

p30- и pK205R-ИФА: ПП>25% — положительный результат,
 ПП<20% — отрицательный результат,
 20%<ПП<25% — сомнительный результат.

4. Результаты внутрилабораторных и международных сравнительных испытаний подтверждают, что тест-системы p30-ИФА и pK205R-ИФА являются чувствительными, специфичными и позволяют достоверно определять антитела к вирусу АЧС в сыворотках крови свиней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
2. Тимина А.М., Якулов М.Р., Щербак А.В. Результаты участия в международных сравнительных испытаниях по диагностике африканской чумы свиней // Ветеринария сегодня. — 2015. — №1 (12). — С. 9–14.
3. African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. — 7th ed. — Paris, France, 2012. — Vol. 2, Chapter 2.8.1. — P. 1067–1079.
4. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Res. — 2013. — Vol. 173, № 1. — 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. Rodríguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 3. — P. 950–956.
6. Escribano J.M., Pastor M.J., Sánchez-Vizcaíno 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, № 7. — 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. Rodríguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // J. Virol. Methods. — 1997. — Vol. 64, № 1. — P. 27–35.

8. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C.I. Alcaraz, F. Rodríguez, J.M. Oviedo [et al.] // J. Virol. Methods. — 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 in *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, № 9. — P. 3114–3121.

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

11. Sancey-Vizcaino J.M. African swine fever // Dis. of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. — 9th ed. — Ames, Iowa, 2006. — P. 291–298.

12. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Methods. — 2000. — Vol. 89, № 1–2. — P. 129–136.

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

UDC 619:616.98:578.842.1:616-078

USE OF p30, pK205R AND pB602L RECOMBINANT PROTEINS FOR AFRICAN SWINE FEVER SERODIAGNOSIS

M.R. Yakupov¹, A.S. Yakovleva², A.V. Scherbakov³

¹ Leading Veterinarian, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mapat.89@mail.ru

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

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

SUMMARY

p30, pK205R and pB602L recombinant proteins of African swine fever (ASF) virus were generated by expression in *E. coli*. Indirect ELISA for detection of antibodies to ASF virus was developed on the base of the said recombinant proteins. Diagnostic specificity of pK205R- and pB602L-ELISA tests systems was 99,8%, p30-ELISA – 99,5%. Diagnostic sensitivity p30-ELISA/pK205R-ELISA and pB602L-ELISA was 100% and 94,12%, respectively, when the reference panel of positive sera was used. The sensitivity p30-ELISA and pK205R-ELISA used for testing sera from experimentally and naturally infected animals was found to be higher than that one of commercial test systems and comparable to the ELISA recommended by the World Animal Health Organization for ASF serological diagnosis. High p30-ELISA and pK205R-ELISA specificity and sensitivity were confirmed by results of international proficiency testings for ASF diagnosis.

Key words: African swine fever (ASF), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), recombinant proteins, antibodies.

The World Animal Health Organization (OIE) recommends to use enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with partially purified proteins of ASF virus propagated in MS cell culture as an antigen (hereinafter, OIE-ELISA) as the main method for serological diagnosis of ASF [6]. Preparation of such antigen is difficult to standardize as well as associated with biological risks. Moreover, though OIE-ELISA has high sensitivity its specificity is rather low [4]. Therefore, extensive investigations are carried out to develop recombinant antigens that are biologically safe, easily producible and confer high specificity to ELISA and to use them for ASF serodiagnosis. So far, use of some recombinant proteins, p54 [7, 8], p30 [9, 12], pp62 [5], p10, p72, pA104R, pC44L, pCP312R [13], pK205R and pB602L for ASF serological diagnosis has been reported [10].

The works described in the paper were aimed at development of p30, pK205R and pB602L recombinant proteins by their expression in *E. coli* and development of indirect ELISA based on them and comparison of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA against each other and with commercial test systems designed for ASF serological diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. Russian ASF virus isolate «Orenburg-2008» was used as a source of ASF virus.

The virus DNA extraction was performed by affine sorption on glass fiber filters.

Polymerase chain reaction (PCR). A reaction mixture is prepared for PCR that contains 5 µl of 10× PCR buffer, 3 mM Mg²⁺, 0,2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA-polymerase, primers (10 pmol/primer), 5 µl of DNA solution and water to bring the volume up to 50 µl. The reaction is performed in the Mastercycler DNA amplifier (Eppendorf, Germany). The procedure includes initial 3 min denaturation at 94°C and 35 PCR runs: 30 sec denaturation at 94°C, 30 sec primer annealing at 55°C and 40 sec elongation at 72°C. The reaction products were analyzed by electrophoresis in 2,0% agarose gel containing 0,001% ethidium bromide at 50 mA.

Molecular cloning of amplicons was performed using common methods [1].

Expression and purification of recombinant proteins. *E. coli* was cultivated in orbital shaker at 150 rpm and 37°C. IPTG (Promega, USA) was added to induce expression in log-phase cell culture. The level of expression and sizes of recombinant proteins were determined by 12% polyacrylamide gel electrophoresis.

The recombinant proteins were purified by metal-chelate chromatography using His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma, USA) as a sorbent.

Porcine sera. Reference sera containing antibodies to ASF virus were obtained from the EU Reference Laboratory for ASF (ASF-URL, CISA-INIA, Madrid, Spain). Positive reference serum (catalogue code – ASF-CP) was used as positive control in ELSIA. Reference panel of sera (catalogue code – ASF-Ref-1) was used for ELISA diagnostic sensitivity assessment.

Sera from a pig experimentally infected with Russian ASF virus isolate recovered in ASF outbreak occurred in the Pskov Oblast in 2014 were provided by staff members of the FGBI «ARRIAH» Reference Laboratory for ASF. The pig survived after infection with «Antonovo 07/14» virus isolate and was re-infected with ASF virus on day 32 after first infection.

Field sera from naturally ASF infected pigs were obtained from OOO «PKh «Lazarevskoe pig farm», Tula Oblast, where ASF outbreak was reported in January 2014.

To determine ELISA diagnostic specificity sera collected from breeding pigs imported to the Russian Federation from ASF-free EU member states were used as known negative sera.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Development of ELISA based on p30, pK205R and pB602L recombinant proteins was the subject of our investigations. The ELISA procedure is described in Results and Discussion section.

The ELISA using INGENASA INGEZIM PPA COMPAC test kit (Ingenasa, Spain) was performed in accordance with its manufacturer's instructions.

Statistical processing of data. ELISA diagnostic sensitivity and specificity were calculated using the OIE recommended formulas:

$$D_{\text{sensitivity}} = (TP / TP + FN) \times 100\%;$$

$$D_{\text{specificity}} = (TN / TN + FP) \times 100\%,$$

where TP – true positive result;

FN – false negative result;

TN – true negative result;

FP – false positive result [3].

RESULTS AND DISCUSSION

Production of recombinant proteins. CP204L, K205R and B602L genes were PCR amplified using DNA of Russian ASF virus isolate. Primers containing Bam HI и Hind III restriction sites were used for PCR. Amplicons previously treated with appropriate restriction enzymes were cloned in the expression plasmid vector downstream to T5 promoter.

Transformation of *E. coli* JM109 competent cells by recombinant plasmids resulted in generation of clones expressing p30, pK205R and pB602L recombinant proteins of ASF virus. Molecular weights of recombinant proteins corresponded to the estimated ones (Fig. 1).

Experiments aimed at the optimization of expression and purification conditions were carried out to increase the yield of the recombinant proteins. Purified highly concentrated recombinant protein preparations were successfully produced owing to the optimization of all parameters. The yields of purified protein per 100 µl of *E. coli* culture were as follows: 1,75 µg of p30, 1,5 µg of pK205R and 2 µg of pB602L.

The recombinant proteins were tested for their antigenicity with indirect ELISA using control porcine sera at 1:20 dilution. Relationship between mean optical density of control sera and recombinant antigen concentration

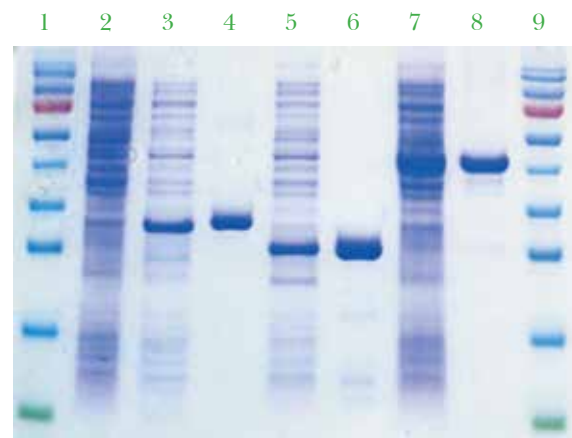


Fig. 1. Expression of p30, K205R and pB602L recombinant proteins of ASF virus in *E. coli*, analysis in 12% polyacrylamide gel
1 and 9 – protein molecular weight marker (Fermentas);
2 – *E. coli* non-recombinant strain lysate (negative control);
3, 5 and 7 – expression of p30, pK205R and pB602L recombinant proteins, respectively, in *E. coli*;
4, 6 and 8 – purified p30, pK205R and pB602L recombinant proteins, respectively.

is given in Fig. 2. All three proteins had pronounced antigenicity.

Development of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA. Indirect ELISA for detection of antibodies to ASF virus in porcine virus was developed on the base of p30, pK205R and pB602L. Optimal conditions of the assay was determined: working antigen concentration, serum and conjugate dilution, composition of blocking solution, temperatures and timing of each ELISA step. Also, acceptable optical densities of control sera and cut-off value and reproducibility of the ELISA results were determined.

Based on the optimization results the following indirect ELISA procedure was established. Recombinant protein at working dilution in 0,05M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9,6) was added to each well of a plate (100 µl per well) and incubated at +4°C for 16–18 hours. Then, plates were washed three times with PBST buffer (NaCl – 8,0 g; KCl – 0,2 g; Na₂HPO₄ – 2,8 g; K₂HPO₄ – 0,2 g; Tween-20 – 0,05% per litre of the solution; pH 7,3). The wells were blocked with PBST supplemented with 3% milk solution: 100 µl of the solution were added to each well and the wells were incubated at 37°C for 1 hour. The plates were washed with PBST three times. Tested sera diluted at 1:20 in blocking buffer were added to wells (100 µl per well) and incubated at 37°C in thermostatic shaker for 1 hour. Then, the plates were again washed and conjugate (Sigma, USA) at working dilution was added. The plates were incubated under the same conditions. After washing ABTS substrate was added and the reaction was stopped by adding 1% sodium dodecyl sulfate solution 10–15 later. The results were read by spectrophotometer at 405 nm. Positiveness percentage of (PP) was calculated using the following formula:

$$(\text{OD of sample} - \text{OD C}^-) / (\text{OD C}^+ - \text{OD C}^-) \times 100\%,$$

where OD of sample – optical density of tested serum;
OD C⁻ – optical density of negative control serum;

OD C⁺ – optical density of positive control serum.

The sera were considered negative if PP was less than 20%, sera were considered positive if PP was greater than or equal to 25% and sera were considered inconclusive if PP is more than 20%, but less than 25%.

Determination of ELSIA analytical specificity and sensitivity. The ELISA was tested for its analytical specificity in porcine sera containing antibodies to classical swine fever, porcine reproductive and respiratory syndrome viruses, porcine circovirus 2, influenza Aujezsky's disease viruses and parvovirus. All sera were negative when tested with pK205R-, pB602L- and p30-ELISA.

To test ELISA for its sensitivity two-fold serial dilutions of reference positive serum were prepared. The end-point serum dilutions where ASF antibodies were detected were as follows: 1:640 for pK205R-ELISA, 1:1,280 for p30-ELISA and 1:320 for pB602L-ELISA. Thus, p30-ELISA had the highest analytical sensitivity and pB602L-ELISA demonstrated the lowest analytical sensitivity.

Determination of ELSIA diagnostic specificity and sensitivity. To determine ELISA diagnostic specificity 1000 sera known to be ASF negative collected from pigs imported to the Russian Federation from the ASF-free West European countries were tested. Therewith, 2 false positive results were obtained when the sera were tested with pK205R – ELISA and pB602L-ELISA and 5 false positive results were obtained when the sera were tested with p30-ELISA. Thus, pK205R-ELISA and pB602L-ELISA specificity was 99,8%, p30-ELISA specificity was 99,5%.

The ELISAs were tested for their sensitivity using the reference panel of sera designed for validation of serological methods of ASF diagnosis. The panel was provided by the EU Reference Laboratory for ASF (ASF-URL, CISA-INIA, Madrid, Spain), it contained 22 samples: 17 ASF- positive and 5 ASF- negative ones. Antibodies to ASF virus were detected in all positive sera tested with p30- and pK205R-ELISA. Positive serum № 14 was tested negative by pB602L-ELISA (Table 1). Hence, the diagnostic sensitivity of p30- and pK205R-ELISA used for testing the reference panel of sera was 100%, and pB602L-ELISA sensitivity was 94,12%.

Thus, comparative tests showed that both analytical and diagnostic sensitivities of pB602L-ELISA were inferior to those ones of pK205R-ELISA and p30-ELISA. Moreover, during investigations pB602L recombinant protein was found to have another disadvantage it rather quickly lost its antigenicity under storage. Due to such non-stability during the storage it had to be regularly «re-titrated» i.e. its working concentration was to be determined all over again. Unlike with pB602L protein, pK205R and p30 recombinant antigens were highly stable under storage. Taking all of this into account two tests, p30-ELISA and pK205R-ELISA, out of three developed ones were selected for further works. Both tests showed 100% sensitivity with reference panel and their specificity was greater than 99%.

Comparison between p30-ELISA/pK205R-ELISA and commercial test-kits. Comparison of the developed test-systems and commercial test-kits for ASF serological diagnosis was one of the aims of the works. Comparative analysis of the test systems for their sensitivity was performed using porcine sera from a pig experimentally infected with ASF virus. p30- and pK205R-ELISA detected antibodies to ASF virus in all serum samples collected from the pig on day 9-63 after infection (Table 2). Similar results were obtained when the samples were tested with INGENASA INGEZIM PPA COMPAC test-kit (Ingenasa, Spain). No antibodies were initially detected with the ELISA test-kit for diagnosis of African swine fever in pigs (ARRIVV&M ASF-ELISA Ab/Ag) (GSI ARRIVV&M, Pokrov, Russia) in serum collected from the pig on day 9 after infection but the said serum was found to be weakly positive when it was retested with the same test-kit of another batch (the data on tests with the

said test-kit were provided by A.S. Pershinin, staff-member of the Reference Laboratory for ASF, FGBI «ARRIAH»).

Tests of field sera. Eighteen serum samples from pigs were obtained from ASF outbreak (OOO «PKh Lazarevskoe», Tula Oblast) in January 2014. ASF virus DNA was detected by PCR in all 18 serum samples. It confirmed that the blood samples had been collected from infected animals. Anti-ASF antibodies were detected in 14 and 13 serum samples tested with p30-ELISA and pK205R-ELISA, respectively (Table 3). Similar results (12 positive samples) were obtained when the sera were tested with OIE-ELISA (OIE-ELISA results were provided by Lina Moor, OIE Reference Laboratory for ASF (Madrid, Spain)). However anti-ASF antibodies were detected only in 2 samples tested with INGENASA INGEZIM PPA COMPAC kit (Ingenasa, Spain). Low sensitivity of INGENASA test-kit as well as discrepancies in results of p30-, pK205R-ELISA and OIE-ELISA for some samples (№№ 1, 2, 6, 11, 12 and 14) in this particular case can be accounted for by very low ASFV antibody titres in field sera, since little time has passed since the infection of animals.

Evaluation of p30-ELISA and pK205R-ELISA during international proficiency tests. In 2013 p30-ELISA and pK205R-ELISA were used during international proficiency tests for ASF diagnosis organized by EU Reference Laboratory for ASF (URL-CISA-INIA, Madrid, Spain). During tests the infectious status of all coded sera was correctly determined [2]. The test results confirmed that the developed p30-ELISA and pK205R-ELISA were sensitive, specific and reliably detected antibodies to ASF virus in porcine sera.

CONCLUSIONS

1. Indirect ELISAs were developed on the base of pK205R, pB602 and p30 recombinant antigens for detection of antibodies to ASF virus in porcine sera.

2. Diagnostic sensitivity of p30-ELISA and pK205R-ELISA determined with reference panel of positive sera was 100% and diagnostic sensitivity of pB602L-ELISA was 94,12%. Diagnostic specificity of p30-, pK205R- and pB602L-ELISA exceeded 99%.

3. When sera from experimentally and naturally infected animals were tested with the said ELISA test-kits

Fig. 2. Antigenicity of pK205R (K1), pB602L (K2) and p30 (K3) recombinant proteins of ASF virus tested by indirect ELISA with control porcine sera

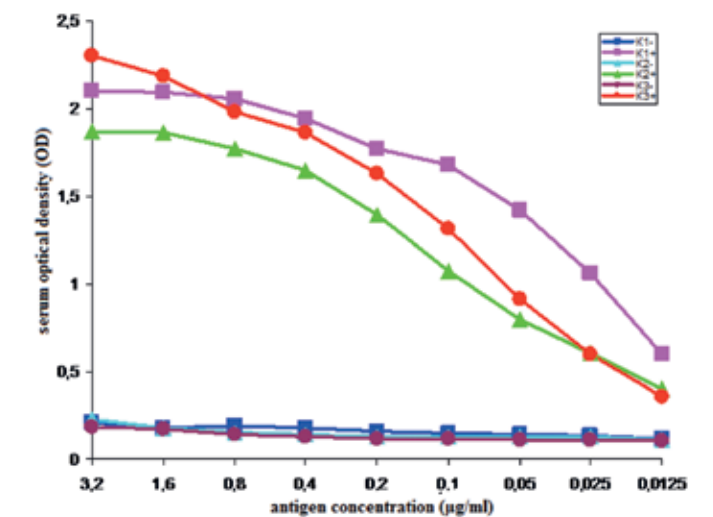


Table 1
Results of testing reference panel of sera with ELISA test-systems

№ Sample	Sample status (serum)	ASF virus isolate	Test-system		
			p30-ELISA	pK205R-ELISA	pB602L-ELISA
1	negative	-	-3,01%	-2,54%	-1,19%
2	positive	E75/E70 (SPAIN)	115,18%	128,48%	138,47%
3	positive	E75/E70 (SPAIN)	106,23%	51,07%	47,97%
4	positive	Ken05.Tk1 (KENYA)	97,14%	85,39%	33,82%
5	negative	-	-2,54%	-1,18%	-1,54%
6	weakly positive	E75/E70	98,33%	45,16%	36,98%
7	positive	E75/E70 (SPAIN)	108,75%	130,17%	135,21%
8	weakly positive	E75/E70	86,58%	46,15%	36,58%
9	negative	-	-2,94%	-1,15%	-2,38%
10	positive	E75/E70	69,39%	63,38%	39,46%
11	positive	E75/E70	104,71%	122,62%	103,50%
12	positive	E75/E70	65,92%	62,93%	39,07%
13	strongly positive	NHV/L60	96,81%	80,17%	38,80%
14	positive	NHV/L60	83,37%	75,73%	5,29%
15	strongly positive	NHV/L60	113,64%	94,10%	40,24%
16	strongly positive	NHV/L60	103,00%	118,47%	76,04%
17	negative	-	0,68%	1,16%	-4,92%
18	negative	-	0,29%	0,97%	-6,49%
19	strongly positive	NHV/L60	112,96%	114,51%	76,16%
20	strongly positive	NHV/L60	100,29%	58,99%	63,78%
21	positive	NHV/L60	107,93%	99,71%	44,08%
22	positive	NHV/L60	71,85%	107,25%	98,86%

p30-, pK205R- and pB602L-ELISA: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result.

Table 2
Results of testing sera collected from the pig experimentally infected with ASF virus

Day after infection	Test-system			
	p30-ELISA	pK205R-ELISA	ARRIVV&M ASF-ELISA	INGENASA
4	-3,15	-9,34	0,106	38,4
9	65,19	53,66	0,270	66,7
12	74,59	67,43	0,300	82,0
16	74,80	69,14	0,328	80,8
21	92,53	70,42	0,453	88,5
24	95,73	72,88	n/t	87,3
40	106,41	88,36	0,6009	93,5
43	105,66	89,64	0,6107	96,8
50	115,27	80,35	n/t	97,4
63	119,75	102,88	1,0559	100,0

p30- and pK205R-ИФА: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result;

INGENASA: <40% – negative result, >40% but <50% – inconclusive result, >50% – positive result;

ARRIVV&M ASF-ELISA: positive control – 1.874, negative control – 0,118.

Samples with OD that is 2,5 or more times higher than that one of negative control, i.e. more than 0,295, – positive, less than 0,295 – negative;

ARRIVV&M ASF-ELISA used for retesting the serum collected on day 9 after infection (new batch of the test kit): positive control – 1,407, negative control –

0,10095. Samples with OD that is 2,5 or more times higher than that one of negative control, i.e. more than 0,252, – positive, less than 0,252 – negative;

n/t – not tested.

Table 3
Results of testing field sera from pigs in ASF outbreak (000 «PKh Lazarevskoe»)

№ Serum	Test-system			
	p30-ELISA	pK205R-ELISA	INGENASA	OIE-ELISA
1	26,87	18,89	neg.	neg.
2	36,27	21,46 (inconclusive)	neg.	pos.
3	32,28	42,93	neg.	pos.
4	45,06	51,09	pos.	pos.
5	39,91	41,95	neg.	pos.
6	23,59 (inconclusive)	39,38	pos.	neg.
7	11,09	14,55	neg.	neg.
8	41,60	38,14	neg.	pos.
9	35,12	43,02	neg.	pos.
10	17,03	16,23	neg.	neg.
11	27,94	51,09	neg.	neg.
12	13,30	13,48	neg.	pos.
13	30,60	48,43	neg.	pos.
14	32,11	42,22	neg.	neg.
15	35,30	50,91	neg.	pos.
16	54,99	54,46	neg.	pos.
17	53,84	49,14	neg.	pos.
18	31,93	55,43	neg.	pos.

p30- and pK205R-ELISA: PP>25% – positive result, PP<20% – negative result, 20%<PP<25% – inconclusive result.

p30-ELISA and pK205R-ELISA sensitivity were superior to that one of commercial test-kits and were comparable with that one of OIE-ELISA.

4. Results of intralaboratory and international proficiency tests confirm that p30-ELISA and pK205R-ELISA test systems are sensitive, specific and reliably detect antibodies to ASF virus in porcine sera.

REFERENCES

- Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. Genetic Engineering Techniques. Molecular cloning. – M.: Mir, 1984. – 480 p.
- Timina A.M., Yakupov M.R., Scherbakov A.V. Results of participation in the international proficiency tests for ASF diagnosis // Veterinary Today. – 2015. – № 1 (12). – P. 9–14.
- African swine fever // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. – 7th ed. – Paris, France, 2012. – Vol. 2, Chapter 2.8.1. – P. 1067–1079.
- African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Res. – 2013. – Vol. 173, № 1. – P. 159–167.
- Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodríguez [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 950–956.
- Escobedo J.M., Pastor M.J., Sánchez-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, № 7. – 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. Rodríguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // J. Virol. Methods. – 1997. – Vol. 64, № 1. – P. 27–35.

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

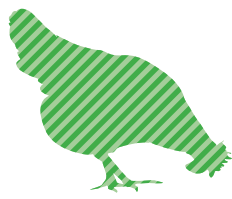
9. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in Trichoplusia ni larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3114–3121.

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

11. Sancey-Vizcaino J.M. African swine fever // Dis. of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 291–298.

12. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Merelo [et al.] // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89, № 1–2. – P. 129–136.

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



УДК 916:616.98:578.384.11:636.52/58

ТКАНЕВОЙ ТРОПИЗМ И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР (ОБЗОР)

Али Шебли Дандал¹, В.В. Макаров²

¹ аспирант, Российский университет дружбы народов, г. Москва, e-mail: alidandal@mail.ru

² доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Инфекционный бронхит кур является одной из наиболее значимых болезней промышленного птицеводства. Считается, в основном, заболеванием респираторной системы, различные штаммы вируса инфекционного бронхита кур могут демонстрировать вариабельность тканевого тропизма и поражать репродуктивные органы, а также почки с серьезными последствиями. Некоторые штаммы вируса размножаются в кишечнике, но без патологических изменений.

Ключевые слова: инфекционный бронхит кур, патогенез, репродуктивный синдром, респираторный синдром, нефрозо-нефритный синдром.

UDC 916:616.98:578.384.11:636.52/58

TISSUE TROPISM AND CLINICAL MANIFESTATION OF CHICKEN INFECTIOUS BRONCHITIS (REVIEW)

Ali Shebli Dandal¹, V.V. Makarov²

¹ post-graduate student, Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow, e-mail: alidandal@mail.ru

² Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow

SUMMARY

Chicken infectious bronchitis is one of the most important diseases for commercial poultry production. It is regarded generally as a respiratory system disease; different strains of chicken infectious bronchitis virus can demonstrate variability of tissue tropism and affect reproductive organs as well as kidneys with severe effects. Some virus strains propagate in intestines but without pathological changes.

Key words: chicken infectious bronchitis, pathogenesis, reproductive syndrome, respiratory syndrome, nephrosonephritis.

ВВЕДЕНИЕ

Изучению патогенеза прежде не придавали значения при исследовании вируса — об этом свидетельствуют работы некоторых авторов [3, 5, 7]. Это положение теперь изменилось, и появилась необходимость в изучении механизмов развития инфекционных болезней. В последние годы изучению механизмов патогенности было определено главенствующее место [1, 4, 6].

Впервые инфекционный бронхит кур наблюдали в 1931 г. в штате Северная Дакота (США) под названием «новая болезнь дыхательных органов цыплят» [33].

Доклад по клиническим признакам и предварительным лабораторным исследованиям этих случаев, сделанный Schalk A., Hawn M. в 1931 г., рассматривается как первый отчет по ИБК, а этиологический агент впервые был выделен в 1937 г. [28, 33]. Вначале считалось, что этому заболеванию подвержен только молодняк цыплят, но дальнейшие исследования показали, что инфекционный бронхит встречается также у кур-несушек. Другие проявления инфекционного бронхита, включающие уменьшение количества яиц у несушек, были отмечены в 1940 г. вслед за обычным респираторным заболеванием, а поражение почек было выявлено в 60-е гг.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИОННОМ БРОНХИТЕ КУР

Инфекционный бронхит кур (ИБК) — вирусное высококонтагиозное заболевание кур различного возраста, проявляется главным образом поражением органов респираторного и репродуктивного трактов, почек и других органов и систем организма [1, 2, 16, 20, 22, 26].

ИБК вызывает РНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Coronavirus* (от латинского «согона» — корона), семейства *Coronaviridae* [3, 4].

Вирионы вируса ИБК содержат три основных вирусспецифических протеина: гликопротеин шпика (S), гликопротеин мембраны (M) и протеин нуклеокапсида (N). Дополнительно четвертый протеин (малый мембранный протеин SM) ассоциирует с мембранной оболочкой. Протеин S состоит из двух или трех копий: каждая, в свою очередь, представлена двумя гликополипептидами S1 и S2. Антигеммагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела индуцируются белком S1 [17, 30] (рис. 1).

ПАТОГЕНЕЗ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИБК

Верхние дыхательные пути — основное место размножения вируса ИБК, затем в результате вирусемии

вирус получает широкое распространение в других тканях организма. Вирус является, в основном, эпителиотропным и проникает в клетки путем виропексиса [9]. Работы с применением иммунофлуоресцентной (IF), иммунопероксидазной и электронной микроскопии препаратов трахеи показали репликацию вируса ИБК в реснитчатом эпителии и клетках, секретирующих слизь [10, 22].

В течение клинической фазы заболевания максимальные титры вируса регистрируются в трахеях между 5 и 10 сут. после заражения, но иногда вирус может присутствовать на 28 сут. после заражения [34].

Вирус также размножается в эпителиальных клетках легких и воздушных мешков. Высокие титры вируса наблюдаются в этих тканях между 4 и 11 сут. после заражения [30].

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ИБК

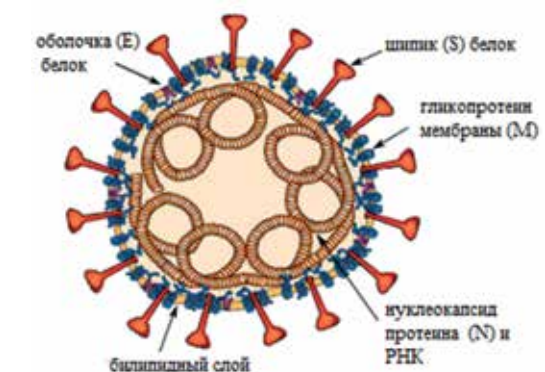
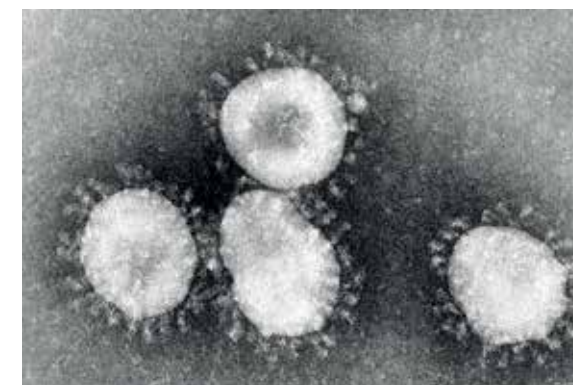
Несколько штаммов вируса ИБК выделены из клоакальных мазков, экскрементов и миндалин слепой кишки [26]. Эксплантаты из некоторых кишечных тканей показаны как среда для выращивания вируса ИБК *in vitro* [24]. В нескольких работах показано, что в тканях пищевода обнаруживали максимальное количество вируса при инфицировании кишечным изолятом ECV2 вируса ИБК [11], а также вирусом, относящимся к серотипу 793/B [23]. Мазки из пищевода также использовали для индикации вируса ИБК в ПЦР [31]. Однако осталось не выясненным, действительно ли вирус размножался в пищеводе, или он попадал туда из трахеи.

Вирус ИБК также выделяли из железистого желудка и тонкого отдела кишечника [9]. Darbyshire J.H. и соавт. [20] показали, что вирус ИБК хуже размножался в тканях железистого желудка *in vitro*, чем в тканях респираторного тракта и в яичниках.

В тканях толстого отдела кишечника репликация вируса ИБК происходит в клетках, подобных гистиоцитам и лимфоидным клеткам, расположенных в миндалинах слепой кишки [34]. С помощью реакции иммунофлуоресценции показано размножение вируса в ворсинках эпителиальных клеток в подвздошной и прямой кишках [9]. Хотя вирус ИБК имеет обширный тропизм, для органов желудочно-кишечного тракта не описаны явные гистологические изменения.

Вариантный штамм вируса ИБК «G» классифицирован как энтеротропный, благодаря его более длительному присутствию в тканях кишечника по сравнению

Рис. 1. Морфология вируса ИБК. Электронная микроскопия и компьютерная модель (www.inosmi.ru) [25]



с респираторными тканями. Кроме того было установлено, что вариантный штамм серотипа 793/В вируса ИБК был более энтеротропный, чем пневмотропный, и даже ассоциировался с диареей у бройлеров [23].

Способность штаммов вируса ИБК выживать при низком pH в присутствии пищеварительных ферментов и желчных солей может свидетельствовать о его кишечной репликации. Otsuki K. и соавт. [34] наблюдали большие потери титров некоторых штаммов, когда выдерживали 3–4 ч при pH 3,0, но более устойчивые штаммы выделить из кишечника не удалось. Ambali A.G. и соавт. [9] сравнили штамм М41 с энтеротропным вариантом «G». Оба вируса имели одинаковую чувствительность к трипсину, но вариант «G» показал в 50 раз большую устойчивость к таурогликохолату натрия, что могло бы частично объяснить его способность к репликации в кишечнике [27].

Вирус ИБК выделяли из гардеровой железы [23], при этом клетки, содержащие вирус, обнаруживали в строме железы при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания. Интраокулярная вакцинация приводила к развитию массовой инфильтрации лимфоцитов, к повышению количества клеток в плазме крови и десквамации тубулярного эпителия в гардеровой железе с восстановлением через 14 сут. после вакцинации [12]. Увеличение числа плазматических клеток и развитие лимфоидной ткани также наблюдали в слезной железе после вакцинации [29].

Вирус ИБК выделяли из бурсы, и вследствие экспериментального заражения цыплят штаммами H52 и H120 наблюдались явные гистологические повреждения этого органа. Хотя вирус ИБК выделен из ряда других органов, таких как печень [9] и селезенка [30], не подтверждена его связь с какими-либо функциональными изменениями. Вирус ИБК выделяли также из спермы и яиц.

МЕХАНИЗМ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА В ОРГАНИЗМЕ

Репликация и транскрипция РНК коронавируса происходит в цитоплазме инфицированных клеток путем почкования (рис. 2). Вирион коронавируса прикрепляется к рецептору клетки-хозяина с помощью шипа гликопротеина и, в зависимости от штамма вируса, протеин шипов вириона гликозилируется во время трансляции и транспортируется в аппарат Гольджи (АГ). Вирионы накапливаются в пузырьках гладкой эндоплазматической сети, прежде чем освободиться [8, 13].

Вирионы содержат три основных структурных белка — S, N и M и минорный оболочечный белок SM или E. Молекулы основного фосфопротеина N, взаимодействуя с геномной РНК, образуют протяженный нуклеокапсид со спиральной симметрией, диаметром 9–11 нм. Нуклеокапсид окружает липопротеиновая оболочка, которая формируется из шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) или АГ зараженных клеток. Гликопротеин М — это трансмембранный белок, довольно глубоко погруженный в оболочку. На наружной поверхности липидного бислоя оказывается лишь небольшой гликозилированный N-концевой участок молекулы белка [8, 15]. Предполагают, что гликопротеин М способствует включению нуклеокапсида в оболочку вириона при почковании.

Гликопротеин-предшественник S (180–200 кДа) является структурным белком пепломеров. Посттрансляционно он нарезается протеазами на 2 части — S1 и S2

гликопротеины. Небольшая его часть погружена в липидный бислой, а большая часть молекулы находится снаружи. Гликопротеин S1 содержит основные антигенные детерминанты, индуцирующие синтез серотип-специфических и вируснейтрализующих антител, а также играет роль антирецептора, с помощью которого вирусная частица прикрепляется к рецепторам клетки и вызывает слияние мембран [8, 14, 32].

При трансляции гликопротеин S включается в мембрану ШЭР и гликозилируется путем переноса олигосахаридов на аспарагиновые остатки растущей полипептидной цепи. А в АГ или на плазматической мембране белок S расщепляется протеазами клетки-хозяина на две большие субъединицы S1 и S2, что является необходимым условием для проявления инфекционности вируса [8, 35].

Было установлено, что гликопротеин S переносится на плазматическую мембрану и экспонируется на поверхности инфицированных клеток, что может делать клетки чувствительными к лизису под действием противовирусных антител и комплемента [8, 15].

Коронавирусы обладают некоторыми уникальными особенностями транскрипции РНК, состава белков, а также механизмов сборки вирионов и прикрепления к рецепторам клеток-мишеней своими пепломерами [28].

Вирионы коронавируса образуются путем почкования от мембран ШЭР и АГ. Нити нуклеокапсида выстраиваются в месте почкования на цитоплазматической поверхности этих мембран в упорядоченный ряд на участках, содержащих вирусные гликопротеины. На мембранах ШЭР или АГ белки клетки-хозяина исключаются из почкующихся вирионов и заменяются вирусными гликопротеинами [8, 21].

Почкования вирионов, которые содержат собранный нуклеокапсид, проходят в полости ШЭР и АГ. Таким образом, внутри клетки могут образовываться зрелые вирионы, возможно, даже до того, как белок S перейдет на плазматическую мембрану и сделает клетку чувствительной к иммунному воздействию. Поэтому покрытые оболочкой вирусы этого типа почкуются в месте, которое не подвергается действию иммунной защиты хозяина. Возможно, именно этим объясняется персистенция коронавируса в организме хозяина, обладающего иммунитетом.

Вирионы некоторых вирусов могут выходить из клетки лишь при ее гибели, однако коронавирусы способны выходить также из интактных клеток, по-видимому, с помощью механизма клеточной секреции [18, 19]. Способность коронавируса выходить из клетки без ее лизиса является важным фактором, обеспечивающим возможность умеренной (нецитопатической) инфекции.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПРИ ИБК

При инфекционном бронхите отмечают три клинических синдрома: респираторный, нефрозо-нефритный и репродуктивный.

Респираторный синдром. Размножение ИБК в тканях респираторного тракта вызывает характерные симптомы, такие как одышка, кашель, трахеальные хрипы и носовые выделения. Иногда наблюдают отеки, воспаленные глаза и опухшие пазухи [10]. В случаях без осложнений эти симптомы сохраняются только 5–7 сут. и исчезают в течение 10–14 сут. У пораженных кур отмечают слабость и снижение аппетита через 3 сут. после заражения [30].

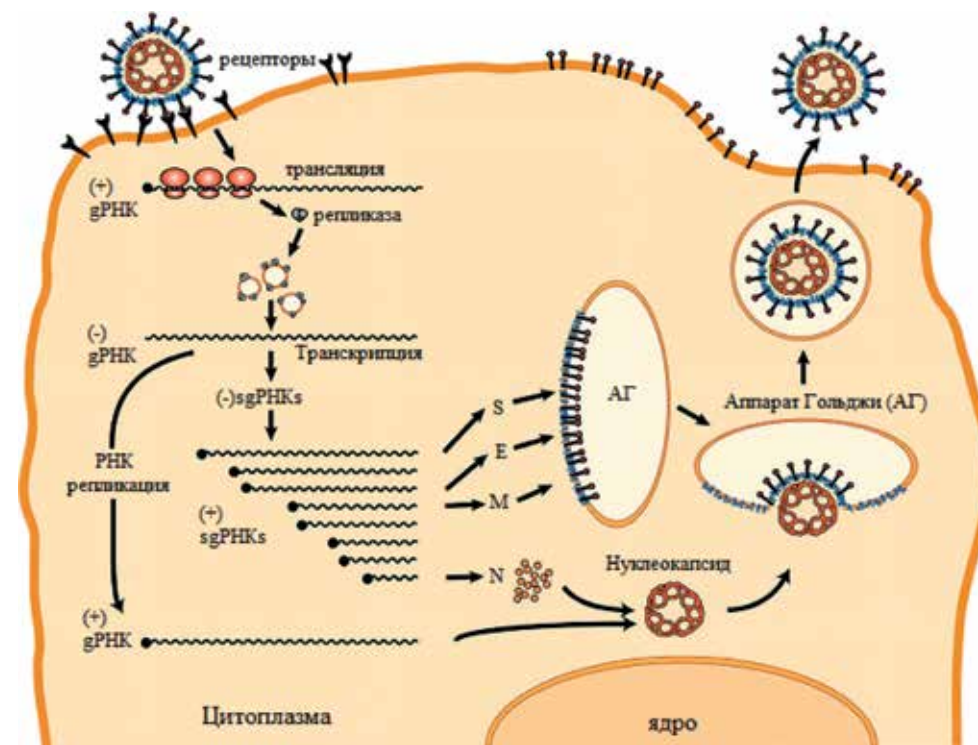


Рис. 2. Репликация и транскрипция РНК коронавируса в чувствительной клетке [25]

Репродуктивный синдром. В процессе изучения заболевания было установлено, что кроме типичных респираторных признаков вирус ИБК может вызывать значительное снижение яйценоскости и далее изменения в скорлупе и ухудшение качества яиц. Такие эффекты могут сопровождаться слабыми респираторными симптомами, или респираторные симптомы могут отсутствовать [9]. Некоторые штаммы вызывают только изменения в окраске скорлупы. Степень снижения яйценоскости изменяется в зависимости от периодов яйцекладки, вирулентности вируса и других неспецифических факторов.

Нефрозо-нефритный синдром. Респираторные признаки выражены слабо и быстро исчезают, у птиц наблюдаются депрессивное состояние, снижение массы тела, взъерошенность оперения, а также поражение почек и мочеточников с отложением уратов. Течение болезни обычно острое. При первичной циркуляции вируса в хозяйстве летальность может достигать 57–70%. Такими свойствами обладают американские штаммы (Gray, Holte), австралийские штаммы (T1, T2), а также ряд штаммов, выделенных в Японии и Китае [31].

У птиц старше 6 недель ИБК чаще протекает субклинически, без ярко выраженных клинических признаков. Заболевание часто протекает в форме хронической инфекции и может приобретать в хозяйстве стационарный характер [19].

Некоторые штаммы ИБК вызывают первоначально респираторные симптомы с развитием нефропатогенных признаков, выражающихся в повышенном потреблении воды и жидком помете. Начало падежа обычно наблюдается на 6 сут. после заражения [9, 10].

ДИАГНОСТИКА ИБК

Предварительный диагноз на ИБК ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, анализа экономических показателей (привесы

живой массы, качественные и количественные показатели яйценоскости), повышения уровня специфических антител, идентификации вирусного генома. Окончательный диагноз ставят после выделения вируса и его идентификации [2].

При постановке диагноза на инфекционный бронхит используют полимеразную цепную реакцию, реакцию нейтрализации, реакцию торможения геммагглютинации, проводят анализ клинической картины и патологоанатомических признаков, а также титров сывороточных антител [1, 3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционный бронхит кур — заболевание кур различного возраста, проявляется поражением респираторных и репродуктивных органов, а также почек.

Тропность и место первичной репликации зависят от штамма вируса ИБК. Штаммы вируса ИБК обладают широким тканевым тропизмом, и клинические проявления болезни могут быть разнообразными. Антигенные различия между штаммами вируса возникают в результате спонтанных мутаций. Известно большое количество серотипов вируса, при этом иммунитет, приобретенный к одному серотипу, не дает перекрестной защиты от заражения другим серотипом, что значительно осложняет профилактику ИБК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антигенные, иммуногенные и реактогенные свойства живой сухой вакцины против ИБК / А.В. Борисов, А.А. Гусев, С.В. Фролов [и др.] // Пробл. инфекц. патол. с-х ж-ных: тез. докл. конф. — Владимир, 1997. — С. 147–148.
2. Борисов А.В., Хлыбова Т.В., Фролов С.В. Инфекционный бронхит кур // Вет. мед. Украины. — 1998. — № 5. — С. 28–29.
3. Бочков Ю.А. Метод штаммовой дифференциации вируса инфекционного бронхита кур и анализ изолятов вируса, выделенных на территории России: дис. ... канд. биол. наук. — Владимир, 1999. — 180 с.

4. Диагностика, профилактика и меры борьбы с вирусными, респираторными и малоизученными болезнями птиц в промышленном птицеводстве: рекомендации / В.В. Герман, В.Ф. Бабкин, Н.Т. Соколенко [и др.]. — Харьков, 1988. — 18 с.
5. Кожемяка Н.В. Эпизоотическая обстановка в птицеводческих хозяйствах и перспективы ее улучшения // Ветеринария. — 1995. — № 12. — С. 3–7.
6. Смоленский В.И. Средства и методы специфической профилактики болезней птиц вирусной этиологии: дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1999. — С. 28–36.
7. Терюханов А.Б. Инфекционный бронхит кур. — Л.: Колос, 1976. — 64 с.
8. Чупина О.А. Использование эксплантатов трахеи куриных эмбрионов и цыплят для изучения возбудителей инфекционных респираторных болезней птиц: дис. ... канд. биол. наук. — Владимир, 2009. — 142 с.
9. Ambali A.G., Jones R.C. Early pathogenesis in chicks with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus // Avian Dis. — 1990. — Vol. 34. — P. 809–817.
10. A «novel» infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy / I. Capua, R.E. Gough, M. Manichini [et al.] // Zentralbl. Veterinarmed. — 1994. — Vol. 41. — P. 83–89.
11. Antigenic domains of the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions / G. Koch, L. Hartog, A. Kant [et al.] // Gen. Virol. — 1990. — Vol. 71. — P. 1929–1935.
12. Avian infectious bronchitis — viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination / H. Toro, V. Godoy, J. Larenas [et al.] // Avian Dis. — 1996. — Vol. 40. — P. 114–120.
13. Boursnell M.E., Binns M.M., Brown T.D. Sequencing of coronavirus genomic RNA: three open reading frames in the 5' unique region of mRNA D // J. Gen. Virol. — 1985. — Vol. 66. — P. 2253–2258.
14. Boursnell M.E., Brown T.D., Binns M.M. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV // Virus Res. — 1984. — Vol. 1. — P. 303–313.
15. Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size and their polypeptide motifs and nature of oligosaccharides // J. Gen. Virol. — 1983. — Vol. 64. — P. 1787–1791.
16. Cavanagh D., Davis P.J., Cook J.K.A. Infectious bronchitis virus: Evidence for recombination within the Massachusetts serotype // Avian Pathol. — 1992. — Vol. 21. — P. 401–408.
17. Cavanagh D. Structural polypeptides of coronavirus infectious bronchitis virus // J. Gen. Virol. — 1981. — Vol. 53. — P. 93–103.
18. Comparative analysis of four Massachusetts type infectious bronchitis coronavirus genomes reveals a novel Massachusetts type strain and evidence of natural recombination in the genome / L. Xiaoli, Y. Shao, H. Ma [et al.] // Infection Genetics and Evolution. — 2013. — Vol. 14. — P. 29–38.
19. Coronaviridae / S.G. Siddell, R. Anderson, D. Cavanagh [et al.] // Intervirology. — 1993. — Vol. 20. — P. 181–189.
20. Darbyshire J.H., Cook J.K.A., Peters R.W. Organ culture studies on the efficiency of infection of chicken tissues with avian infectious bronchitis virus // British J. of Experimental Pathol. — 1976. — Vol. 57. — P. 443–454.
21. Detection of viral antigen following exposure of one-day old chickens to the Holland-52 strain of infectious bronchitis virus / R.L. Owen, B.S. Cowen, A.L. Hattel [et al.] // Avian Pathol. — 1991. — Vol. 20. — P. 663–673.
22. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review / G. Bijlenga, J.K. Cook, J.J. Gelb [et al.] // Avian Pathol. — 2004. — Vol. 33. — P. 550–557.
23. Dhinakar R.G., Jones R.C. Cross-reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis vaccine // Avian Pathol. — 1997b. — Vol. 26. — P. 641–649.
24. Effects of modified live infectious bronchitis virus vaccines on the head-associated lymphoid tissue / R.D. Montgomery, W.R. Maslin, D.L. Magee [et al.] // Avian Dis. — 1994. — Vol. 38. — P. 847–856.
25. Encyclopedia of Virology / ed. B.W.J. Mahy, M.H.V. Van Regenmortel. — 3rd ed. — Amsterdam, 2008. — P. 549–562.
26. Fabricant J. The early history of infectious bronchitis // Avian Dis. — 1998. — Vol. 42. — P. 648–650.
27. Fulton R.M., Reed W.M., Thacker H.L. Cellular responses of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusetts 41 and Australian T infectious bronchitis viruses // Avian Dis. — 1993. — Vol. 37 — P. 951–960.
28. Ignjatovic J., Sapats S. Avian infectious bronchitis virus // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19. — № 2. — P. 493–508.
29. Lucio B., Fabricant J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus // Avian Dis. — 1990. — Vol. 26. — P. 508–519.
30. Otsuki K., Huggins M.B., Cook J.K.A. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens // Avian Pathol. — 1990. — Vol. 19. — P. 467–475.
31. Parsons D., Ellis M.M., Cavanagh D. Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks // Vet. Rec. — 1992. — Vol. 131. — P. 408–411.
32. Phylogenetic analysis of S1 gene of infectious bronchitis virus isolates from China / F. Yan, Y. Zhao, W. Yue [et al.] // Avian Dis. — 2011. — Vol. 55. — P. 451–458.
33. Schalk A.K., Hawn M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks // J. Am. Vet. Med. Assoc. — 1931. — Vol. 78. — P. 413–422.
34. Studies on avian bronchitis virus (IBV). Propagation of IBV in several cultured cells / K. Otsuki, K. Noro, H. Yamamoto [et al.] // Arch. Virol. — 1979. — Vol. 60. — P. 115–122.
35. The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco / M. El-Houadfi, R.S. Jones, J.K.A. Cook [et al.] // Avian Pathol. — 1986. — Vol. 15. — P. 93–105.

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СТРАТЕГИИ ПРОФИЛАКТИКИ И КОНТРОЛЯ ГРИППА ПТИЦ В РОССИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

М.С. Волков¹, В.Н. Ирза², А.В. Варкентин³, А.С. Старова⁴

¹ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

² начальник отдела, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: irza@arriah.ru

³ научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: varkentin@arriah.ru

⁴ заместитель начальника отдела, Россельхознадзор, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена проблеме широкого распространения вируса гриппа птиц в мире и аспектам стратегии профилактики и контроля заболевания в условиях России. Необходимость мониторинга эффективности инактивированных вакцин против гриппа птиц, вызванного «актуальными» эпизоотическими штаммами, связана с эволюцией и изменчивостью вируса. Процесс реассортации вируса гриппа А несет большую опасность для эффективности стратегии вакцинации в качестве альтернативы радикальным мерам. Противостояние новым угрозам через призму времени — основной смысл идеи данной работы.

Ключевые слова: грипп птиц, высокопатогенный, низкопатогенный, профилактика, контроль, эпизоотическая ситуация, вакцинация.

При анализе эпизоотической ситуации по гриппу птиц во времени становится очевидным, что обстановка является нестабильной и изменяется с каждым годом. Так, ветеринарные службы Китайской Народной Республики в 2014 г. сообщили о лабораторно подтвержденных случаях высокопатогенного гриппа, обусловленного серотипами H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H5N8. А низкопатогенный для птиц вирус H7N9 вызвал серьезное остропотекающее респираторное заболевание у человека с высокой летальностью. Циркулирующие вирусы одного подтипа (H5N2 и H7N1 в ЮАР; H5N6 в Лаосе; H5N2 в Тайване) были причиной как высокопатогенного, так и низкопатогенного гриппа. Распространение «нового» вируса H5N8 в европейских странах продемонстрировало незащищенность государств от заноса возбудителей эмерджентных и карантинных инфекций.

Актуальность проблемы профилактики и контроля гриппа птиц типа А определяется опасностью заноса возбудителя на территорию Российской Федерации из

сосредельных государств, изменчивостью и многообразием вариантов вируса в природе, риском проникновения возбудителя в поголовье птиц промышленных предприятий закрытого типа и реальной угрозой для здоровья человека.

Медицинские врачи расценивают грипп как зооантропоноз. Природным резервуаром вируса гриппа типа А в природе являются птицы околородного комплекса, преимущественно из отрядов гусе- и ржанкообразных, носительство у которых часто не сопровождается клинически выраженной болезнью, а их постоянные миграции способствуют распространению и циркуляции вируса в природе и его быстрой эволюции. Большинство случаев высокопатогенного гриппа имели причинно-следственную связь со временем перелета птиц к местам гнездования и зимовок. Фекально-оральный путь заражения ускоряет процесс распространения вируса в экосистеме. Большая часть всех известных вариантов вируса гриппа была изолирована от птиц. Существует гипотеза, что летучие мыши явля-

ются дополнительным природным резервуаром для некоторых вариантов вируса гриппа А [5]. Так, совсем недавно (2010 г.) в популяции летучих мышей *Sturnira lilium* семейства листоносых в Центральной Америке обнаружен новый подтип вируса гриппа H17N10.

Спорадические случаи заражения людей вирусом гриппа подтипа H5N1 регистрируются и по сей день, как правило в азиатских и африканских странах. В Европе подтвержденных случаев заболевания человека гриппом A/H5N1 не зарегистрировано. Хочется отметить, что за период 2003–2014 гг. в 16 странах количество лабораторно подтвержденных случаев заражения человека гриппом H5N1 составило 668, из них 393 случая закончились летальным исходом. Как видно, смертность от гриппа птиц среди инфицированных людей составляет около 60%. Наибольшее количество случаев заболевания (374) и гибели человека (228) зарегистрировано в Египте и Индонезии, где грипп H5 признан эндемичным. Новый подтип вируса H7N9, широко распространившийся с марта 2013 г. в Китае, носителем которого являются птицы, вызвал серьезную озабоченность служб здравоохранения. Всего в 2013–2014 гг. в КНР зарегистрировано 458 подтвержденных случаев заражения человека данным подтипом, из них — 175 с летальным исходом (около 40%) [7]. Следует отметить, что вирус H7N9 не является патогенным для домашних птиц и выявляется, преимущественно, при мониторинговых исследованиях. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) обеспокоена высокой устойчивостью данного вируса к таким противовирусным препаратам, как озельтамивир и занамивир, а также способностью вируса присоединяться к клеткам респираторного тракта человека.

В 2014 г. широкое распространение получил вирус подтипа H5N8, причем не только в азиатских странах, но и в Европе (Германия, Голландия, Великобритания, Италия). Несмотря на то, что специалисты ВОЗ определяют риск возбудителя данного серотипа для здоровья человека как низкий, для промышленного птицеводства высокопатогенный грипп H5N8 представляет реальные угрозы в плане экономических и социальных последствий. Вирус имеет азиатское происхождение, и многие ученые склоняются к тому, что занос вируса и его распространение на территории европейских стран обусловлены миграционными перемещениями диких водоплавающих птиц. Следует подчеркнуть, что высокая смертность отмечается среди кур и низкая — среди уток.

Быстрая эволюция вируса подтипа H5, когда возбудитель гриппа птиц, имеющий родство с рецепторами эпителиа α-2,3 типа у птиц, легко инфицирует клетки нижних отделов респираторного тракта человека с сиалогликопротеидами α-2,6 типа, демонстрирует высокий пандемический потенциал вируса со сменой фекально-орального механизма передачи инфекции на воздушно-капельный путь [3]. Тому подтверждением случаи заражения кошек в Израиле и России, тигров и леопардов в Таиланде, пальмовой цвететты во Вьетнаме. В 2004 г. были опубликованы сведения об экспериментальном заражении кошек вирусом гриппа H5N1 при скормлении им мяса зараженных цыплят. Ученым удалось воспроизвести инфекцию на кошках, которая проявилась тяжелым респираторным синдромом с поражением альвеолярной ткани легких [6].

Высокопатогенный грипп подтипа H5N1 на территории России впервые был зарегистрирован летом

2005 г. в Новосибирской области, где расположены обширные озерные и болотистые пространства Барабинской лесостепи с важнейшими воспроизводственными районами водоплавающих птиц. Появление всех очагов заболевания в регионах Западной Сибири и Южного Урала в июле–октябре 2005 г. было связано с заносом вируса гриппа из Юго-Восточной Азии и первичным возникновением заболевания у диких водоплавающих птиц. Последующее распространение высоковирулентного вируса H5N1 в промышленные птицеводческие предприятия закрытого типа привело к массовому уничтожению восприимчивой птицы и колоссальным экономическим потерям. Кроме радикальных мер, из-за угрозы широкого распространения высокопатогенного гриппа птиц в Российской Федерации с 2006 г. действовала стратегия ограниченной целевой вакцинации домашних птиц, которая проводилась во всех субъектах. Вакцинация охватывала поголовье личных подсобных хозяйств и птицеферм открытого типа, расположенных вблизи водоемов — стоянок диких водоплавающих перелетных птиц [1]. Для иммунизации применялись отечественные инактивированные эмульсионные вакцины на основе эпизоотического штамма вируса гриппа птиц H5N1, занесенного на территорию РФ в июле 2005 г. Применение данной стратегии было направлено на предотвращение передачи вируса восприимчивому поголовью, когда риск контакта между домашними и дикими перелетными птицами был максимальным. Результаты исследований протективной вакцины на основе штамма высокопатогенного гриппа птиц «Новосибирский» 2005 г. (генетическая клада 2.2), проведенных в ФГБУ «ВНИИЗЖ», показали защиту птиц более 90% при заражении гомологичным высоковирулентным вирусом.

В связи со стабилизацией и улучшением эпизоотической ситуации по гриппу птиц H5 в России, начиная с 2010 г. объем профилактической вакцинации с каждым годом уменьшался как по количеству прививок, так и по охвату регионов России. Целевая иммунизация проводилась только в ранее неблагополучных субъектах РФ. Так, если в 2010 г. было привито около 70 млн голов птиц, то в 2011 г. — 30 млн голов, а в 2013 г. — не более 15 млн голов.

Необходимость мониторинга эффективности инактивированных вакцин против гриппа птиц, вызванного «актуальными» эпизоотическими штаммами, связана с непрерывной эволюцией вируса, с изменчивостью его поверхностных антигенов — гемагглютинаина и нейраминидазы. Основные процессы эволюционирования вируса типа А связаны с малой (дрейф) и глубокой (шифт) изменчивостью. По мнению А.А. Смородинцева и Г.И. Александровой, количественные изменения гемагглютинаина и нейраминидазы, происходящие при дрейфе, нарушают родственные связи с исходным вирусом лишь частично, что не препятствует эффективному использованию вакцин из предшествующих штаммов. При глубокой изменчивости сохраняется только внутренний рибонуклеопротеид и полностью заменяется гемагглютинин, реже — нейраминидаза [4]. Такие штаммы появляются в странах Юго-Восточной Азии и способны вызывать крупные эпидемии.

Появление новых вариантов вируса гриппа обуславливает необходимость обновления противогриппозных вакцин на основе современных вакцинных штаммов.

Несмотря на высокую эффективность радикальных мер при ликвидации вспышек гриппа птиц и контроля дальнейшего распространения вируса, во многих эндемичных странах оправданной мерой является профилактическая вакцинация ввиду несоизмеримости экономических потерь и негативных социальных последствий при массовой депопуляции промышленного поголовья птиц (Мексика, Китай, Ближний Восток и др.).

В условиях меняющейся мировой ситуации, появления новых вариантов вируса гриппа, его генетической и антигенной изменчивости необходимо пересмотреть те приемы и способы контроля над гриппом, которые еще 3 года назад были актуальными. В апреле 2008 г. на территории Приморского края был зарегистрирован случай высокопатогенного гриппа у домашних птиц, в результате чего был изолирован вирус H5N1, который отличался от штамма 2005 г. и был отнесен к кладе 2.3.2, а позже, в соответствии с обновленной номенклатурой, к кладе 2.3.2.1. В сентябре 2014 г. вирус, принадлежащий данной генетической кладе, был выделен от домашних птиц в Алтайском крае. Результаты изучения протективной активности «традиционной» вакцины на основе штамма «Новосибирский», применяемой с 2006 г., при контрольном заражении привитых птиц новым эпизоотическим штаммом «Приморский» показали, что защита птиц от клинического проявления болезни и гибели не превышала 70%. При этом в серологических исследованиях была подтверждена варибельность вирусов двух генетических линий в пределах одного штамма. Необходимо отметить, что результаты мониторинговых исследований в некоторых субъектах РФ в ряде случаев показывают низкую напряженность иммунитета к вирусу гриппа H5 у домашних птиц личных подсобных хозяйств (ЛПХ), что свидетельствует о неполном охвате поголовья при вакцинации. Данные обстоятельства ведут к неэффективности профилактических мер в отношении гриппа птиц. Кроме того, возникают определенные трудности при планировании стратегии вакцинации на перспективу, так как невозможно предугадать, какой именно вирус гриппа птиц может быть занесен на территорию РФ. Сохраняется угроза заноса возбудителя в РФ из сопредельных государств, прежде всего Юго-Восточной Азии и Дальнего Востока, где распространены вирусы высокопатогенного гриппа птиц H5N1, H5N2, H5N8 и низкопатогенного гриппа H7N9, H10N8, H9N2. Бессимптомное течение гриппа у диких перелетных птиц маскирует вирусносительство и препятствует раннему выявлению потенциальных угроз.

Y. Sakoda (Университет Hokkaido, Sapporo, Japan) считает, что стратегия вакцинации против гриппа в качестве альтернативы радикальным мерам не может быть полезной, более того, она несет в себе большую опасность для реассортации вирусов и может стать причиной последующих непредсказуемых эпизоотий, обусловленных новыми штаммами-мутантами. При этом автор указывает, что вакцинация против высокопатогенного гриппа птиц является предпосылкой для селекции новых антигенных вариантов вируса [8].

С учетом современной эпизоотической ситуации в мире представляется целесообразным внесение изменений в стратегию контроля. Отмена профилактической вакцинации против гриппа птиц подтипа H5 на территории Российской Федерации будет приемлемой при условии поддержания резерва эффективной вакцины для проведения кольцевой вакцинации вокруг неблагополучных очагов в случае вспышек болезни.

Определенно, самым эффективным оружием против проникновения вируса гриппа на территорию закрытых птицеводческих предприятий остается обеспечение высокого уровня биозащиты. Проводимые в Российской Федерации мониторинговые мероприятия способствуют своевременному обнаружению случаев заноса или очагов инфекции [2]. Наиболее уязвимыми сегментами и по сей день остаются личные подворные хозяйства и мелкие товарные фермы с выгульным способом содержания птиц. Адекватной мерой, с целью раннего обнаружения угроз и своевременного реагирования на них, являются мониторинговые исследования популяций диких и синантропных птиц на предмет выявления как специфических антител, так и возбудителя инфекции, а изоляция личных вариантов вируса гриппа и их изучение позволят оперативно разработать комплекс профилактических мероприятий, наиболее адекватных новым угрозам. Ввиду того, что последние 2 случая (2008, 2014 гг.) высокопатогенного гриппа птиц H5N1 у домашних птиц в России связаны с заносом вируса в ЛПХ с охотничьими трофеями, необходимо уделять пристальное внимание информационному обеспечению населения в отношении профилактики гриппа.

Таким образом, можно выделить основные приоритетные направления в стратегии контроля над гриппом птиц:

1. Проведение эпизоотологического мониторинга с оценкой риска потенциальных путей заноса вируса гриппа на территорию Российской Федерации.
2. Поддержание резерва эффективной вакцины против гриппа птиц с целью оперативного купирования основных путей распространения инфекции.
3. Разработка и мониторинг эффективности инактивированных вакцин в отношении современных эпизоотических штаммов вируса гриппа птиц.
4. Изучение циркуляции вируса гриппа в природных биотопах диких водоплавающих птиц и птиц антропогенного комплекса с применением средств активного мониторинга.
5. Осуществление контроля возможных рисков при проведении экспортно-импортных операций в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) и едиными ветеринарно-санитарными требованиями Таможенного союза.
6. Серологический и вирусологический мониторинг среди домашних птиц ЛПХ и фермерских хозяйств открытого типа с целью установления возможного их контакта с источниками полевого вируса гриппа.
7. Контроль обеспечения высокого уровня биологической защиты на промышленных птицеводческих предприятиях закрытого типа.
8. Проведение информационных мероприятий по противодействию распространению гриппа среди населения страны.
9. Разработка программ по возмещению экономических убытков владельцам птиц при ликвидации вспышек (социально-экономический аспект в борьбе с гриппом).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпизоотологический мониторинг является ключевым элементом в общей стратегии контроля над гриппом птиц. Перспективные планы реализации мониторинговых исследований должны строиться с учетом

развития эпизоотической ситуации в России и в мире (историко-географический аспект планирования), распределения плотности сельскохозяйственной птицы на территории страны и миграционных потоков перелетных птиц.

Быстрая эволюция вируса гриппа А, высокая скорость изменения его патогенных свойств, широкое распространение в природе, возможность преодоления межвидовых барьеров, расширение спектра восприимчивых животных, его пандемический потенциал, непредсказуемые последствия от проникновения на промышленные предприятия обуславливают необходимость усиления мер эпидемиологического и эпизоотологического надзора, совершенствования средств и методов контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прогноз по высокопатогенному гриппу птиц (H5N1) для территории Российской Федерации на 2014 г. / В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ» // Прогнозы по ряду болезней животных в Российской Федерации на 2014 год. — Владимир, 2014. — 24 с.
2. Результаты экспедиции в Республику Тыва в рамках мониторинговых мероприятий по гриппу и ньюкаслской болезни птиц / И.А. Чвала, А.В. Андриясов,

М.А. Циванюк [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2014. — № 4 (11). — С. 54–57.

3. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского» Минздрава России; ред. Д.К. Львов. — М.: Мед. информ. агентство, 2013. — 1197 с.

4. Смородинцев А.А., Александрова Г.И. / Итоги и перспективы вакцинопрофилактики гриппа // Вопросы вирусологии. — 1977. — № 3. — С. 259–271.

5. Щелканов М.Ю., Львов Д.К. / Новый субтип вируса гриппа А от летучих мышей и новые задачи эколого-вирусологического мониторинга // Вопросы вирусологии. — 2012. — № 1. — С. 159–168.

6. Avian H5N1 influenza in cats / Т. Kuiken, G. Rimmelzwaan, D. Van Riel [et al.] // Science. — 2004. — Vol. 306, № 5694. — P. 241.

7. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO / WHO. — URL: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en (дата обращения: 22.03.15).

8. Sakoda Y. / Characterization of avian influenza viruses recently isolated in Japan // International Conference on Avian Influenza: Prevention and Control, November 18–19 2014, New Taipei City/Taiwan. — Taipei, 2014. — 249 p.

UDC 619:616.98:578.832.1:578.831.11:616-076

EPIZOOTOLOGICAL ASPECTS OF AVIAN INFLUENZA PREVENTION AND CONTROL STRATEGY IN MODERN RUSSIA

M.S. Volkov¹, V.N. Irza², A.V. Varkentin³, A.S. Starova⁴

¹ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

² Head of Department, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: irza@arriah.ru

³ Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: varkentin@arriah.ru

⁴ Deputy Head of Department, Rosselkhoznaudzor, Moscow

SUMMARY

The paper is devoted to wide spread of avian influenza virus in the world and the disease prevention and control in Russia. It is necessary to monitor efficacy of inactivated vaccines against avian influenza caused by the currently circulating epizootic strains due to the virus evolution and variability. Reassortment of influenza A virus poses a serious threat to effectiveness of vaccination as an alternative to drastic measures. The message of the paper is to demonstrate how to better meet new challenges from the perspective of time.

Key words: avian influenza, highly pathogenic, low pathogenic, prevention, control, epizootic situation, vaccination.

Chronological analysis of AI epizootic situation clearly demonstrates how unstable and changeable the situation is. Thus, in 2014 the veterinary services of the People's Republic of China reported on HPAI outbreaks caused by serotypes H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H5N8 that had been confirmed by the laboratory tests, whereas H7N9, a low pathogenic avian virus, caused severe acute respiratory disease in humans with high mortality rates. Circulating viruses of the same subtype (H5N2 and H7N1 in the RSA; H5N6 in Laos; H5N2 in Taiwan) caused both highly and low pathogenic avian influenza. Spread of «new» H5N8 virus in the European countries demonstrated how unprotected the countries are from introduction of emerging and quarantine diseases.

An urgent need to address the issues of AI A virus prevention and control is explained by the danger of the agent introduction into the Russian Federation from adjacent countries, by the virus variability and a great number of the virus variants circulating in the wild, by the risk of the agent introduction into the closed-type commercial poultry farms and by the real threat to human health.

Medical doctors consider avian influenza as a zoonothroponosis. Semi-aquatic birds, primarily *Anseriformes* and *Charadriiformes*, are natural reservoirs of AI type A in the wild and their carrier state is often not accompanied by clinical signs; and continuous migrations facilitate the virus spread and circulation and its rapid evaluation. Most cases of HPAI were causally connected with migration of birds to nesting and wintering areas. Fecal-oral infection route accelerates the virus spread in the ecosystem. Most known AIV variants were isolated from birds. Bats are assumed to be another natural reservoir for some of the AIV variants [5]. For example, a new AIV subtype H17N10 was detected not long ago (in 2010) in *Sturnira liliium* bat population of the American leaf-nosed family in Central America.

Sporadic cases of H5N1 are still reported in humans, as a rule, in Asian and African countries. No confirmed human cases of H5N1 were reported in Europe. It is necessary to note that 668 confirmed human cases of H5N1 were reported in 16 countries from 2003–2014 and 393 of them were fatal. The mortality rate in humans because of avian influenza is 60%. Most cases (374) and most deaths (228) were reported in Egypt and Indonesia where H5 influenza was endemic. New virus subtype H7N9 reported in March 2013 in China carried by birds caused serious concern of the public health authorities. Totally, 458 confirmed cases of human infection with the subtype were reported in 2013–2014, 175 of them were fatal (approximately 40%) [7]. It shall be noted that H7N9 virus is not pathogenic for domestic poultry and is primarily detected during monitoring activities. The World Health Organization is concerned about strong resistance of the virus to such antiviral preparations as oseltamivir and zanamivir and by the virus ability to adhere to the cells of human respiratory tract.

In 2014 H5N8 subtype was widely spread not only in the Asian countries but also in Europe (Germany, the Netherlands, Great Britain, Italy). Despite the fact that the WHO experts define the agent as «low risk for human health», the highly pathogenic H5N8 AIV poses real threats to poultry farming due to potential economic and social consequences. The virus is of Asian origin and many scientists tend to think that the virus introduction and its spread in the European territory could be explained by migrations of wild waterfowl. It shall be pointed out that high mortality rates are reported in chickens, but the mortality rate in ducks is low.

Rapid evolution of H5 subtype, when AI agent which is closely related to epithelial α -2,3 type receptors of birds easily affects cells in lower parts of human respiratory tract with α -2,6 type sialoglycoproteids, demonstrates high pandemic potential of the virus; and fecal–oral transmission is replaced by airborne transmission [3]. This statement can be exemplified by influenza cases in cats reported in Israel and in Russia, tigers and leopards in Taiwan, palm civets in Vietnam. In 2004 results were published on experimental infection of cats with H5N1 virus via infected chicken meat fed to them. The researchers successfully reproduced infection in cats and severe respiratory syndrome with affected alveolar tissue could be observed [6].

In the summer of 2005 HPAI H5N1 virus was first reported in Russia in the Novosibirsk Oblast where vast wetlands and lakes are located (Barbinsky Forest Steppe with the most important waterfowl breeding areas). The outbreaks in West Siberia and in the Southern Urals in July–October 2005 were caused by AI introduced from South East Asia and by primary occurrence of the disease in wild waterfowl. Further spread of HPAI H5N1 in commercial closed type poultry farming resulted in mass destruction of susceptible birds and drastic economic losses. In addition to it, since 2006 due to the risk of wide spread of HPAI, the Russian Federation had implemented the strategy of limited target vaccination of domestic poultry. This vaccination programme was implemented in all the RF Subjects. The vaccination covered backyard poultry population and population of open-type farms located close to water bodies—staging area for migratory waterfowl [1]. Inactivated emulsion vaccines of domestic production containing epizootic H5N1 AI virus introduced to Russia in 2005 were used for vaccination. The strategy was aimed at preventing the virus transmission to the susceptible population when the risk of contact between domestic and wild migratory birds was the highest. Tests for protective activity of the vaccine containing HPAI strain Novosibirsky 2005 (Genetic Clade 2.2) were carried out in the FGBI «ARRIAH» and the tests results demonstrated 90% protection in birds infected with homologous high virulent virus.

Taking into account that the epizootic situation on H5 AI in Russia stabilized and improved, since 2010 the scope of preventive vaccination has been gradually narrowed. The number of inoculations decreased, as well as the number of regions in Russia included into the vaccination campaign. Targeted vaccination was carried out only in the previously affected RF Subjects. Thus, if in 2010 approximately 70 million poultry were vaccinated, only 30 million poultry were vaccinated in 2011, maximum 15 million poultry were vaccinated in 2013.

Continuous evolution of the virus associated with variability of its surface antigens — hemagglutinin and neuraminidase, makes it necessary to monitor efficacy of the inactivated vaccines against AI caused by currently circulating epizootic strains. Key evolution processes of type A virus are related to its minor (drift) and major (shift) changes. According to A.A. Smorodintseva and G.I. Alexandrova hemagglutinin and neuraminidase quantitative changes during the drift just partially break the ties with the original virus and they do not hinder efficacy of vaccines containing the previous strains. If major changes take place, only inner ribonucleoprotein is preserved and hemagglutinin is totally replaced (neuraminidase is seldom replaced) [4]. Such strains occur in South East Asia and are able of causing large-scale epidemics.

New variants of AI virus justify the update on anti-influenza vaccines containing new, currently circulating vaccine strains.

Despite the fact that the drastic measures taken to fight AI and to control its further spread are rather effective, many endemic countries treat preventive vaccination as a rather appropriate tool due to non-measurable economic losses and negative social consequences caused by depopulation of commercial poultry (Mexico, China, Middle East and etc.).

Taking into account changing global situation, occurrence of new AIV variants, the virus genetic and antigenic variability, it is required to review those AI control tools that used to be up-to-date three years ago. In April, 2008

an outbreak of HPAI in poultry was reported in the Primorsky Krai, when H5N1 virus was isolated. The strain differed from the one isolated in 2005 and was first assigned to Clade 2.3.2 and then due to updated classification to Clade 2.3.2.1. In September 2014 the virus from this genetic clade was isolated from poultry in the Altai Krai. Tests for protective activity of the «conventional», Novosibirsk strain-based vaccine that had been used since 2006 demonstrated, following the challenge of the vaccinated poultry with new epizootic strain «Primorsky», that the protection of poultry from clinical signs and death was maximum 70%. The serological tests also confirmed variability of the virus of the two genetic lineages within one strain. It is necessary to note that the monitoring tests carried out in some RF subjects demonstrated low immunity level to H5 AI virus in backyard poultry, thus, suggesting insufficient scope of vaccination leading to non-effective AI preventive measures. In addition to it, there may be certain difficulties when drafting vaccination strategy for future, since it is impossible to predict which AIV might be introduced to the RF territory. The risk of AIV introduction from adjacent countries is still there, primarily from South East Asia and the Far East, where HPAI viruses H5N1, H5N2, H5N8 and LPAI virus H7N9, H10N8, H9N2 circulate. Asymptomatic AI in wild migratory birds simply conceals the virus carrier state and hampers early detection of potential threats.

Y. Sakoda (Hokkaido University, Sapporo, Japan) thinks that vaccination against AI cannot be a useful alternative to drastic measures, in addition to it, it poses great risk associated with the virus reassortment and can be a reason for the following unpredictable epizooties caused by new mutated strains. The author points to the fact that vaccination against HPAI can be a precondition for selection of new antigenic variants of the virus [8].

Taking into account current epizootic situation in the world, it is reasonable to put amendments into the control strategy. It will be acceptable to cancel preventive vaccination against H5 AIV in the Russian Federation, if reserves of efficient vaccine are maintained in order to ensure ring vaccination around the affected areas in case of an outbreak.

High-level biosafety is definitely the most effective way to prevent AI virus from penetrating into closed-type poultry farms. Monitoring measures taken in the RF facilitate timely detection of AI introduction and outbreaks [2]. Backyards and small commercial farms with free-range poultry are still most vulnerable. In order to early detect the threats and timely respond to them, it is appropriate to ensure monitoring in populations of wild and synanthropic birds for specific antibodies and for infectious agents and to isolate new AIV variants. Research into the new virus variants will help to rapidly develop a set of preventive measures to control the new risks. Taking into account that the two latest outbreaks of HPAI H5N1 (2008, 2014) reported in poultry in Russia were caused by the virus introduced to the backyards with hunting trophies, it is required to pay special attention to public awareness campaign for AI prophylaxis.

The following major priority directions can be, thus, determined to control AI:

1. Epizootic monitoring with the risk assessment for potential AI virus introduction to the RF territory.
2. Reserves of efficient vaccines against AI shall be maintained in order to rapidly block major routes of infection transmission.
3. Development of inactivated vaccines against currently circulating epizootic AIV strains and monitoring their efficiency.

4. Study AI virus circulation in natural biotopes of wild waterfowls and birds of anthropogenic areas using active monitoring tools.

5. Control of possible import/export risks in compliance with the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE) and common veterinary and sanitary requirements of the Customs Union.

6. Serological and virological monitoring of backyard poultry and poultry on the open-type commercial farms in order to establish if they may have any contact with the field AI virus.

7. Control of ensuring high level of biosafety at commercial closed-type poultry farms.

8. Public awareness campaigns for AI prevention.

9. Development of economic loss compensation programs for poultry owners implemented during outbreak eradication (social and economic aspect of AI control).

CONCLUSION

Epizootological monitoring is a key element in the overall AI control strategy. Future monitoring tests shall be planned in accordance with the epizootic situation in Russia and in the world (historical and geographical planning), density of the agricultural poultry population in the country and migration routes.

The strong need to strengthen epidemic and epizootic surveillance and to improve control tools and methods is explained by the rapid evolution of type A AI virus, rapid changes of its pathogenic properties, wide spread in the wild and its ability to overcome interspecies barriers, wide range of susceptible animals; the virus pandemic potential and unpredictable consequences of its penetration into the commercial farms.

REFERENCES

1. Prognosis for HPAI H5N1 in the Russian Federation in 2014 / V.N. Irza, M.S. Volkov, A.V. Varkentin [et al.]; FGBI «ARRIAH» // Prognoses for some animal diseases in the Russian Federation in 2014. — Vladimir, 2014. — 24 p.
2. Expedition to the Republic of Tyva within monitoring of AI and Newcastle disease / I.A. Chvala, A.V. Andriyasov, M.A. Tsyvanyuk [et al.] // Veterinary Today. — 2014. — № 4 (11) — P. 54–57.
3. Virology Manual. Human and animal viruses and viral infections / FGBI «Ivanovsky Institute of Virology» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ed. D.K. Lyvov. — M.: Med. Inform. Agency, 2013 — 1197 p.
4. Smorodintsev A.A., Alexandrova G.I. Results and prospects of AI vaccine prophylaxis // Voprosy Virusologii. — 1977. — № 3. — P. 259–271.
5. Schelkonov M.Yu., Lyvov D.K. New subtype of AI A type isolated from bats and new objectives of eco-virological monitoring // Voprosy Virusologii. — 2012. — № 1 — P. 159–168.
6. Avian H5N1 influenza in cats / T. Kuiken, G. Rimmelzwaan, D. Van Riel [et al.] // Science. — 2004. — Vol. 306, № 5694. — P. 241.
7. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO / WHO. — URL: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en (data of application: 22.03.15).
8. Sakoda Y. Characterization of avian influenza viruses recently isolated in Japan // International Conference on Avian Influenza: Prevention and Control, November 18–19 2014, New Taipei City/Taiwan. — Taipei, 2014. — 249 p.

УДК 619:578.825.1:57.082.26

ПРИМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДУЛЬБЕККО DMEM/F12 НАМ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНОВ КУР

Е.Ю. Ханюкова¹, М.А. Шустова², Н.Е. Камалова³

¹ ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: Elena.Urjevna@gmail.com

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

³ главный научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kamalova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Изучена возможность применения питательной среды Дульбекко DMEM/F12 Нам для культивирования вируса болезни Марека в культуре клеток фибробластов эмбрионов кур. Определили, что при оптимально подобранных параметрах культивирования вируса в монослое клеток использование данной среды позволяет получить вирусный материал с высокой инфекционной активностью агента.

Ключевые слова: вирус болезни Марека, культура клеток фибробластов эмбрионов кур, питательная среда Дульбекко DMEM/F12 Нам, инфекционная активность.

UDC 619:578.825.1:57.082.26

USE OF DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM DMEM/F12 HAM FOR MAREK'S DISEASE VIRUS CULTIVATION IN CHICKEN EMBRYO FIBROBLASTS

Ye.Yu. Khanyukova¹, M.A. Shustova², N.Ye. Kamalova³

¹ Leading Biologist, Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: Elena.Urjevna@gmail.com

² Leading Biologist, Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shustova@arriah.ru

³ Chief Researcher, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kamalova@arriah.ru

SUMMARY

The opportunity of using Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 Ham for Marek's disease virus cultivation in chicken embryo fibroblasts was studied. It was determined that if appropriate virus cultivation parameters are chosen the abovementioned medium enables to prepare virus material with high agent infectivity.

Key words: Marek's disease virus, chicken embryo fibroblasts, Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 Ham, infectivity.

ВВЕДЕНИЕ

В качестве биологической системы для культивирования вируса болезни Марека (ВБМ) в производстве используют первично трипсинизированную культуру клеток фибробластов эмбрионов SPF-кур (ФЭК) [4, 5]. ВБМ обладает высокой степенью ассоциации с клеткой. Поэтому основная задача заключается в получении наибольшего количества жизнеспособных вирусосодержащих клеток. Для жизнеспособности клеток *in vitro* необходимо учитывать ряд физико-химических и метаболических факторов. Известно, что на процессы формирования монослоя культуры клеток существенное влияние оказывают состав и качество используемой питательной среды, в которой содержатся все необходимые для этого компоненты (макро-, микроэлементы, аминокислоты, витамины, глюкоза). Кроме того, применение различных поддерживающих питательных сред после инфицирования монослоя оказывает влияние на результаты накопления вируса в клетках, что обуславливает варьирование показателей инфекционной активности получаемых вирусосодержащих препаратов [1, 3].

Технология промышленного культивирования культуры клеток ФЭК в ФГБУ «ВНИИЗЖ» и производство вирусосодержащей суспензии ВБМ осуществляется с использованием питательной среды, состоящей из равных частей среды 199, Игла и гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса (ГЛАХ) с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота. Известно, что при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридов, широко применяют среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с содержанием F12 Ham и двойным содержанием аминокислот.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности применения питательной среды Дульбекко DMEM/F12 Ham для культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Вакцинный производственный штамм «3004 №109-ДЕП» ВБМ.

Культура клеток. Для культивирования вируса и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток ФЭК, которую получали из 11-суточных эмбрионов SPF-кур фирмы Valo Biomedica (Германия). Культивирование культуры клеток ФЭК осуществляли на внутренней поверхности стеклянных роллерных сосудов емкостью 3 дм³ при температуре 38,5±1,0 °С в течение 24–48 ч. Посевная концентрация составляла 1,3±0,08 млн кл./см³, объем засеваемой суспензии — 300 см³.

Для определения инфекционной активности вируса культуру клеток выращивали в культуральных пластиковых флаконах фирмы Corning (25 см²) при температуре 38,5±1,0 °С. Средняя посевная концентрация клеток была 0,8±0,03 млн кл./см³.

Растворы и реактивы. В работе использовали: питательную среду, состоящую из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ (контроль), и коммерческую питательную среду фирмы Sigma Дульбекко DMEM/F12 Ham. Для роста клеток применяли питательную среду с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, а для поддержания культуры клеток процент сыворотки снижали до 2–5%. Величина pH ростовых и поддер-

живающих сред составляла 6,9–7,2. Для дезагрегации инфицированного монослоя ФЭК применяли 0,25% раствора трипсина.

Культивирование вируса. В выращенную в роллерных сосудах культуру клеток ФЭК одновременно с заменой ростовой среды на поддерживающую вносили ВБМ в дозе 10⁴ ФОЕ/см³ на сосуд. ВБМ культивировали при температуре 38,5±1,0 °С в течение 72–96 ч. Контроль за состоянием инфицированного монослоя клеток проводили с помощью ежедневной микроскопии. При распространении ЦПД вируса на 75% площади монослоя культуру клеток подвергали дезагрегации раствором трипсина и центрифугировали. Вирусосодержащие клетки ресуспендировали в питательной среде с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота в расчете 10 см³ на сосуд. В полученных образцах определяли концентрацию клеток и инфекционную активность вируса.

Определение концентрации клеток. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Число клеток в 1 см³ суспензии определяли по формуле:

$$C = A/n \times 2,5 \times 10^6 \times B,$$

где C — число клеток в 1 см³ суспензии;

A — количество учтенных клеток;

n — число больших квадратов, участвующих в подсчете;

B — кратность разведения суспензии.

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционный титр вируса определяли по числу фокусобразующих единиц (ФОЕ) в монослое клеток ФЭК, выращенных во флаконах. Использовали метод последовательных разведений вирусосодержащей суспензии. Для оценки титра вируса устанавливали наименьшее разведение, при котором число ФОЕ было максимальным, без слияния фокусов. Величину титра определяли по следующей формуле:

$$T = \{[(b_1 + b_2 + \dots + b_n)/n] \times 10^6\} / V,$$

где T — титр вируса, ФОЕ/см³;

b₁, b₂, ... b_n — количество фокусов во флаконе;

n — количество используемых флаконов;

V — объем суспензии вируса, внесенный во флакон, см³;

a — показатель степени разведения вирусосодержащего материала.

Обработка результатов экспериментов. Использовали общепринятые методы вычисления средних значений и стандартных ошибок (±m) [2]. Для вычислительных операций использовали программу Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытания каждой из питательной сред проводили не менее чем на 9 роллерах с культурой клеток ФЭК. Величина исходной посевной концентрации клеток была постоянной и составляла 1,3±0,08 млн кл./см³. В варианте № 1 (контроль) использовали питательную среду, состоящую из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ, а в варианте № 2 — среду Дульбекко DMEM/F12 Ham. Исследования по сравнению двух вариантов культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК оценивали по выходу вирусосодержащих клеток (C, млн кл./см³), а также по показателю инфекционной активности (T, Ig ФОЕ/см³). Полученные результаты представили в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о существенной разнице концентрации вирусинфицированных клеток

в суспензии (p≤0,05), полученной при использовании среды Дульбекко DMEM/F12 Ham, в сравнении со средой, состоящей из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ, в 1,2 раза. Это может быть обусловлено наличием большего набора ростовых факторов в питательной среде Дульбекко DMEM/F12 Ham, вследствие чего пролиферация клеток происходила интенсивнее и, вероятно, плотность монослоя на 1 см² была выше, чем в варианте № 1. Однако и лимитирующие условия в варианте № 2 со средой Дульбекко DMEM/F12 Ham наступали быстрее, чем в контроле, вследствие чего наблюдали дегенерацию инфицированного монослоя к моменту окончания культивирования. При сравнении инфекционной активности вируса значимых различий между двумя вариантами культивирования не обнаружено. В варианте № 1 (контроль) на 1 млн кл./см³ приходилось в среднем ~0,37 Ig ФОЕ/см³, а во втором — ~0,32 Ig ФОЕ/см³. Это означает, что распространение вируса с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham происходило медленнее относительно контроля. Вышеперечисленные обстоятельства могли сказаться на показателях полученного вирусосодержащего материала.

Поскольку инфекционный титр культивированного вируса является наиболее важным показателем для процесса производства вакцин против болезни Марека, исследования были продолжены. На следующем этапе работы исходная посевная концентрация для среды Дульбекко DMEM/F12 Ham была снижена до 1,01 млн кл./см³ (т.е. в 1,2 раза). Посевную концентрацию клеток ФЭК для контроля не меняли. Производили оценку по тем же показателям, что и ранее (табл. 2).

По данным табл. 2 видно, что такие показатели, как урожай клеток и инфекционный титр вируса с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham, были выше аналогичных показателей контроля, однако статистических отличий выявлено не было. Дегенеративных изменений монослоя при культивировании ВБМ в культуре клеток ФЭК с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham в заданных условиях постановки эксперимента не наблюдали.

Вышесказанное позволяет считать, что для культивирования монослоя культур клеток ФЭК с последующим инфицированием и накоплением ВБМ можно успешно применять среду Дульбекко DMEM/F12 Ham. При оптимизации условий культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК с использованием данной среды возможно получить вирусосодержащий материал с высокой инфекционной активностью агента, что немало важно при производстве эффективных вирусвакцин против болезни Марека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что питательная среда Дульбекко DMEM/F12 Ham может быть успешно применена для

Таблица 1
Результаты оценки культивирования вируса болезни Марека в культуре клеток ФЭК (n=4)

№ варианта	Концентрация клеток, млн кл./см ³	Инфекционная активность вируса, Ig ФОЕ/см ³
1	16,87±0,44	6,18±0,21
2	19,60±0,49*	6,33±0,20

* существенность среднего контраста определяли проверкой выполнимости неравенства, имеющего вид $t \geq t_p$, где t_p — табличное значение Стьюдента для избранного уровня значимости (p) и данного числа степеней свободы ($v=n_1+n_2-2$).

Таблица 2
Накопление вируса болезни Марека в культуре клеток ФЭК (n=4)

№ варианта	Концентрация клеток, млн кл./см ³	Инфекционная активность вируса, Ig ФОЕ/см ³
1	17,78±0,37	6,64±0,18
2	18,87±0,39	6,90±0,15

— существенность среднего контраста определяли проверкой выполнимости неравенства, имеющего вид $t \geq t_p$, где t_p — табличное значение Стьюдента для избранного уровня значимости (p) и данного числа степеней свободы ($v=n_1+n_2-2$).

культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК в качестве альтернативного варианта среды, используемой в ФГБУ «ВНИИЗЖ». При оптимально подобранных параметрах культивирования вируса в монослое клеток ФЭК использование данной среды позволяет получить вирусосодержащий материал с высокой инфекционной активностью агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спирер, Г.Д. Адамс, Дж.Б. Гриффитс [и др.]. — М.: Агропромиздат, 1989. — Т. 2. — С. 5–8.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих // Методы культивирования клеток: сб. научных трудов. — Л.: Наука, 1988. — С. 44–63.
4. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. — М.: Мир, 1989. — 333 с.
5. Calnek B.W., Witter R.L. Marek's disease // Diseases of Poultry / ed. B.W. Calnek [et al.]. — Ames, Iowa. — 1997. — P. 369–413.

ВСПЫШКА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ H5N1 НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ В 2014 Г.: ПРИЧИНЫ И ОПЫТ ЛИКВИДАЦИИ

М.С. Волков¹, А.В. Варкентин², В.Н. Ирза³, А.С. Старова⁴

¹ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

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

³ начальник отдела, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: irza@arriah.ru

⁴ заместитель начальника отдела, Россельхознадзор, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Большинство случаев высокопатогенного гриппа имеют причинно-следственную связь со временем перелета птиц к местам гнездования и зимовок. Последние случаи гриппа подтипа H5N1 в России были связаны с заносом вируса на территорию личных подсобных хозяйств граждан с охотничьими трофеями (Приморский край, 2008 г.; Алтайский край, 2014 г.). Данные инциденты доказывают неоспоримую роль мигрирующих диких птиц в поддержании циркуляции и распространении вируса гриппа. Единственным эффективным способом защиты промышленных птицеводческих предприятий на сегодняшний день остается неукоснительное соблюдение требований биологической защиты, предъявляемых к птицеводствам закрытого типа. Самыми уязвимыми секторами в отношении угрозы заноса вируса гриппа являются мелкие фермерские и личные подворные хозяйства с выгульным содержанием птиц. В настоящей статье представлен анализ причин вспышки высокопатогенного гриппа H5 на территории Алтайского края в 2014 г. и опыт ее ликвидации.

Ключевые слова: высокопатогенный грипп птиц, противоэпизоотические мероприятия, карантин, дезинфекция.

H5N1 HIGHLY PATHOGENIC INFLUENZA IN ALTAYSKY KRAI IN 2014: CAUSES AND ERADICATION

M.S. Volkov¹, A.V. Varkentin², V.N. Irza³, A.S. Starova⁴

¹ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

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

³ Head of Department, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: irza@arriah.ru

⁴ Deputy Head of Department, Rosselkhoznadzor, Moscow

SUMMARY

Most of HPAI cases are associated with the periods of birds' migration to wintering and nesting areas. The last H5N1 cases in Russia were caused by virus introduction into backyards with hunting trophies (Primorsky Krai, 2008; Altaysky Krai, 2014). The said cases prove the indisputable role of migrating wild birds in influenza virus circulation and spread maintenance. Today the only effective way to protect commercial poultry farms is a strict compliance with the biosecurity rules for closed poultry farms. Speaking about the threat of avian influenza introduction the most vulnerable sectors are small farms and backyards where free ranged poultry is kept. The paper presents the analysis of H5 HPAI outbreak causes in the territory of the Altaysky Krai in 2014 and eradication activities.

Key words: highly pathogenic avian influenza, anti-epidemic measures, quarantine, disinfection.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов, влияющих на особенности проявления эпизоотического процесса, является эколого-географическая характеристика территории. Алтайский край расположен на юго-востоке Западной Сибири на стыке Западно-Сибирской равнины и Алтайских гор. Равнинная часть края представлена степью и лесостепью. Многообразие ландшафтов и водных акваторий этой местности способствует привлечению многих видов перелетных птиц. По большей части края пролегают пути пролета птиц (гусеобразных, куликов и др.), составляющих западно-азиатско-африканский миграционный поток [2]. В 2005 г. в Алтайском крае было зарегистрировано 17 вспышек высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1 среди домашних птиц в 10 районах (Завьяловский, Рубцовский, Романовский, Егорьевский, Хабарский, Волчихинский, Баевский, Мамонтовский, Новичихинский, Тюменцевский), в 2006 г. — 2 вспышки в Алейском и Кулундинском районах [1]. В 2007 г. эпизоотическая обстановка нормализовалась, и до 3 квартала 2014 г. новых инцидентов гриппа отмечено не было. По прогнозам развития эпизоотической ситуации по гриппу птиц Алтайский край входит в зону высокой степени риска.

АНАЛИЗ ПРИЧИН ЗАНОСА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

В сентябре 2014 г. в популяции домашних птиц личных подворных хозяйств граждан Новичихинского района Алтайского края зарегистрирована вспышка высокопатогенного гриппа птиц. Район расположен в юго-западной части края, состоит из 16 сел и поселков. На территории расположено 5 озер, самое крупное из них — оз. Горькое.

Результаты эпизоотологического расследования показали, что занос вирулентного вируса в популяцию домашних птиц был обусловлен доставкой в личные подворные хозяйства (ЛПХ) зараженных охотничьих трофеев — диких уток, добытых в день открытия осеннего сезона. Первичные очаги высокопатогенного гриппа располагались в ЛПХ охотников (с. Долгово, пос. Ильинский Новичихинского р-на) (рис. 1).

По данным эпизоотологического расследования установлено, что каждым охотником было отстрелено по 5 голов дичи (дикие утки), которая в необработанном виде доставлена в ЛПХ для потребительских целей. Потрошение диких птиц проводилось непосредственно во дворах граждан. Со слов охотников пух и перо после разделки были утилизированы путем сжигания в печи, а внутренние органы были скормлены собакам. Домашние птицы содержались выгульным способом и могли иметь непосредственный контакт с инфицированным материалом. С учетом того, что первые случаи внезапной гибели домашних птиц без видимых клинических признаков отмечены 6 сентября 2014 г., а занос вируса в хозяйство произошел 30 августа 2014 г. (открытие сезона охоты), следует предположить, что инкубационный период заболевания не превышал 6 суток. Вторичные очаги инфекции выявлены в соседних ЛПХ граждан, имевших хозяйственные отношения с подворьями — первичными очагами. Первое сообщение о падеже птиц поступило в КГБУ «Управление ветеринарии по Новичихинскому району» 14 сентября 2014 г. Проведено срочное эпизоотологическое обследование, по результатам которого было установлено, что в с. Долгово птицы содержались на 162 под-

ворьях, а в пос. Ильинский — на 22 подворьях. В связи с подозрением на грипп птиц 17 сентября 2014 г. был утвержден «План противоэпизоотических и профилактических мероприятий при подозрении на грипп птиц на территории села Долгово Новичихинского района Алтайского края».

Первоначальная лабораторная диагностика была проведена в КГБУ «Алтайская краевая ветеринарная лаборатория». Диагноз был подтвержден в ФГБУ «Новосибирская МВЛ» и ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В результате оперативного реагирования ветеринарных служб Алтайского края распространения вируса за пределы неблагополучных пунктов не произошло, а отсутствие промышленных птицеводческих предприятий в радиусе 300 км минимизировало угрозы заноса вируса на птицефабрики Павловского и Первомайского районов.

ОПЫТ ЛИКВИДАЦИИ ВСПЫШКИ

В обеспечение требований п. 29.3 Правил по борьбе с гриппом птиц [4] 19 сентября 2014 г. на территории с. Долгово и пос. Ильинского Новичихинского района Алтайского края был введен карантин. В соответствии с приказом Управления ветеринарии № 314-п от 19 сентября 2014 г. был разработан и утвержден план противоэпизоотических мероприятий по предупреждению и ликвидации гриппа птиц.

В рамках проведения противоэпизоотических мероприятий при въезде и выезде в неблагополучные пункты установлены контрольно-пропускные посты с действующими дезбарьерами (рис. 2). Для обработки транспорта использовалась автомобильная установка ДУК, заправленная 4% раствором гидроокиси натрия. Передвижение транспорта было ограничено, допущенные автомобильные средства проходили дезинфекционную обработку. В соответствии с ограничениями был закрыт доступ на все неблагополучные подворья посторонним лицам. Входы ЛПХ были оборудованы дезбарьерами, ежедневно заполняемыми дезраствором (рис. 3). Работа бригады дезинфекторов осуществлялась ежедневно с проведением контроля качества обеззараживания. Проведен учет поголовья птиц в неблагополучных пунктах, до владельцев доведены сведения и рекомендации по содержанию животных в условиях карантина, проведены мероприятия по бескровному убою и уничтожению восприимчивого поголовья на подворьях граждан. В условиях карантина был введен запрет на торговлю и перемещение птиц

Рис. 1. Неблагополучные пункты по высокопатогенному гриппу птиц в Алтайском крае (2014 г.)

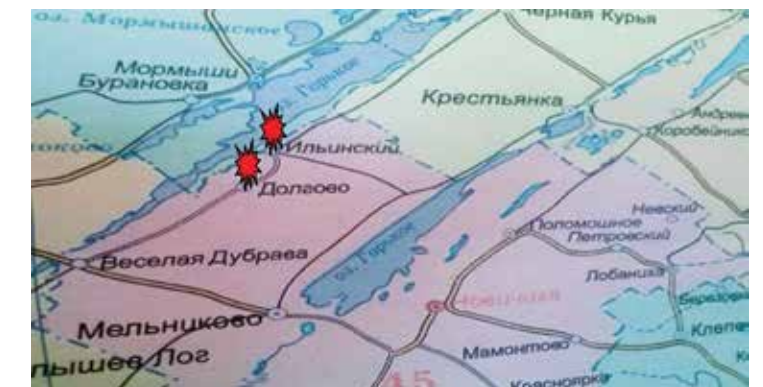




Рис. 2. Карантин. Контрольно-пропускной пункт, оборудованный дезбарьером

и птицеводческих продуктов. Многие граждане до обращения в ветеринарную службу региона захоронили павших птиц на территории дворов. В целях недопущения распространения вируса гриппа противозпизоотической бригадой проведена эксгумация трупов павших птиц, а место захоронений обеззаражено хлорной известью, на подворьях проведена дезинфекция 4% раствором гидроокиси натрия.

Уничтожение птиц было произведено способом сжигания в траншее скотомогильника на территории с. Долгово с последующей обработкой хлорной изве-

Рис. 3. Вход в ЛПХ, оборудованный дезбарьером



стью. Помет после предварительной дезинфекции был также утилизирован на скотомогильнике (рис. 4).

Ежедневно проводился ветеринарный осмотр ЛПХ неблагополучных пунктов. Последний падеж зарегистрирован 22 сентября 2014 г. С населением была проведена разъяснительная работа по поводу возникшей угрозы, распространены листовки и памятки о профилактике гриппа птиц. Руководителям птицефабрик и птицевладельцам открытого типа направлены письма об усилении мер биологической безопасности с целью исключения проникновения вируса на территорию промышленных предприятий. Необходимо отметить, что в Алтайском крае проводится ограниченная целевая вакцинация против гриппа птиц в птицеводствах открытого типа по содержанию гусей и уток, однако в неблагополучных населенных пунктах вакцинация в 2014 г. не проводилась ввиду их удаленности.

Специалисты, работающие в неблагополучных пунктах, были обеспечены необходимым запасом средств индивидуальной защиты (СИЗ), гигиены и медикаментами (противовирусные препараты). После работы в очагах все комплекты СИЗ уничтожались путем сжигания.

В процессе организации мониторинговых исследований были обследованы акватории близлежащих озер и отобраны пробы биологического материала от диких и синантропных птиц.

В соответствии с п. 34 гл. 9 Правил по борьбе с гриппом птиц [4], 14 октября 2014 г. с с. Долгово и пос. Ильинского Новичихинского района Алтайского края ограничительные мероприятия были сняты (постановление губернатора Алтайского края № 473). Заключительный отчет во Всемирную организацию здравоохранения животных (МЭБ) о разрешении случая высокопатогенного гриппа птиц поступил 5 ноября

2014 г. Согласно Кодексу МЭБ [3], территория Алтайского края восстановила утраченный статус благополучия по гриппу птиц, подлежащему обязательной нотификации, по истечении 3-месячного срока со дня проведения заключительной дезинфекции при обеспечении усиленных мер санитарного надзора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Источником возбудителя высокопатогенного гриппа птиц на территории Алтайского края в 2014 г. были дикие водоплавающие птицы, добытые на озерах Новичихинского района и доставленные в личные подворья охотников с. Долгово и пос. Ильинского. Предполагаемыми факторами рассеивания вируса гриппа подтипа H5N1 стали потрошение дичи на территории подворья с загрязнением окружающей среды кровью и пометом, скормливание необработанных потрохов животным, хозяйственные связи с соседними подворьями граждан и несвоевременное обращение населения в ветеринарную службу. Возможным механизмом передачи вируса стал алиментарный путь заражения.

Несмотря на то, что сигнал о падеже домашних птиц в ветеринарную службу поступил через неделю после его начала, накопленный опыт и оперативное реагирование на угрозу позволили достаточно быстро локализовать вспышки, стабилизировать эпизоотическую ситуацию и не допустить дальнейшего распространения инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас вспышек высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации / В.М. Гуленкин, В.Н. Ирза, А.В. Фролов [и др.]. — Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2008. — 553 с.



Рис. 4. Территория скотомогильника с. Долгово Алтайского края

2. Бондарев А.Ю. Мониторинг инфекционных болезней диких птиц в лесостепной области Алтайского края: автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Барнаул, 2010. — 23 с.

3. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1–2 / МЭБ. — 23-е изд. — Paris, France, 2014. — 730 р.

4. Правила по борьбе с гриппом птиц: утв. приказом Минсельхоза России от 27 марта 2006 г. № 90. — М., 2006. — 12 с.

Рис. 5. Организация мониторинговых исследований в угрожаемой зоне



VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ВЫЯВЛЕНИЕ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Г.С. Скитович¹, Н.Б. Шадрова², О.В. Прунтова³

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

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

³ руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Vibrio parahaemolyticus — грамотрицательные галофильные бактерии, которые встречаются в морских и прибрежных водах по всему миру и являются возбудителем острого гастроэнтерита человека пищевого происхождения. В редких случаях *V. parahaemolyticus* вызывает раневую инфекцию, инфекции уха или сепсис у лиц с ослабленным иммунитетом. Были описаны более 80 серотипов на основе антигенных свойств соматических (O) и капсульных (K) антигенов. *V. parahaemolyticus* характеризуется наличием двух факторов вирулентности: термостабильного прямого гемолизина (tdh) — белка, который способствует инвазии бактерии в организме человека, и TDH-зависимого гемолизина (trh), который играет аналогичную роль, как и tdh, в патогенезе заболевания. Большинство штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из окружающей среды или морепродуктов, в отличие от клинических штаммов, не производят термостабильный tdh-гемолизин и TDH-зависимый гемолизин trh. В статье представлены биологические свойства, особенности патогенеза, распространенность и методы выделения *V. parahaemolyticus*.

Ключевые слова: *Vibrio parahaemolyticus*, гастроэнтерит, вспышки пищевых отравлений.

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS: SPREAD, DETECTION AND IDENTIFICATION TECHNIQUES

G.S. Skitovich¹, N.B. Shadrova², O.V. Pruntova³

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

² Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ Head of Testing Centre, Doctor of Sciences (Biology), Proffesor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

SUMMARY

Vibrio parahaemolyticus are gram-negative halophilic bacteria found in marine and coastal waters all over the world which cause acute food-borne gastroenteritis in humans. Rarely *V. parahaemolyticus* cause wound infections, infections of ears or sepsis in individuals with a compromised immune system. More than 80 serotypes were described worldwide based on antigenic properties of the somatic (O) and capsular (K) antigens. *V. parahaemolyticus* are characterized by two factors of virulence: thermostable direct hemolysin (tdh), a protein which facilitates the invasion of the human body by the bacterium, and a TDH-related hemolysin (trh) which plays the same as TDH role in the disease pathogenesis. Most *V. parahaemolyticus* strains isolated from the environment or sea products in comparison to clinical strains do not produce any thermostable direct hemolysin (TDH) or TDH-related hemolysin (trh). The paper presents *V. parahaemolyticus* biological properties, pathogenesis peculiarities, their spread and detection techniques.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, gastroenteritis, food-borne disease outbreaks.

ВВЕДЕНИЕ

При анализе микробиологического риска, связанного с микрофлорой рыбы и рыбных продуктов, следует принимать во внимание наличие патогенных бактерий, естественно обитающих в прибрежных водах [8]. Одной из таких значимых бактерий является *Vibrio parahaemolyticus* — грамотрицательная галофильная палочка, обитающая в теплых морских водах [8, 21, 33, 37].

V. parahaemolyticus была впервые обнаружена Т. Fujino в 1950 г. как возбудитель пищевых заболеваний, явившийся причиной крупной вспышки в Японии, при которой было зарегистрировано 272 заболевших с 20 смертельными случаями [24]. В настоящее время установлено, что 20–30% всех случаев пищевых отравлений в Японии вызвано наличием *V. parahaemolyticus* в морепродуктах. Столь высокие цифры обусловлены традиционным для этой страны употреблением в пищу сырых морепродуктов, что является распространенной причиной отравлений во многих азиатских странах [9, 27, 30]. Несколько вспышек гастроэнтерита, вызванного *V. parahaemolyticus*, описаны в США [16]. С момента своего открытия *V. parahaemolyticus* была признана ведущей причиной пищевых отравлений морепродуктами, производящимися во всем мире. Вирулентные штаммы *V. parahaemolyticus* передаются через употребление сырого или недостаточно термически обработанного морепродукта, особенно устриц, и являются распространенной причиной острого гастроэнтерита [16, 31]. В редких случаях *V. parahaemolyticus* вызывает инфекции на коже, когда в открытую рану попадает теплая морская вода; инфекции уха или сепсис, которые могут быть опасными для жизни людей с ослабленным иммунитетом [33, 37].

Занимая различные экологические ниши, *V. parahaemolyticus*, благодаря наличию одного полярного жгутика, может существовать в воде в свободном плавании или же быть прикрепленной к инертным поверхностям, таким как взвешенные частицы, зоопланктон, рыбы, моллюски и ракообразные [20, 34]. В зависимости от условий окружающей среды, *V. parahaemolyticus* может находиться в капсульной и бескапсульной формах. Соматические (O) и капсульные (K) антигены используются для классификации штаммов [13].

Распределение *V. parahaemolyticus* в морской среде связано с температурой воды, данный микроорганизм редко выявляется, если температура воды ниже 15 °C [18].

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА

Семейство *Vibrionaceae* объединяет подвижные, изогнутые палочковидные бактерии, обладающие полярными жгутиками. Эти микроорганизмы эволюционно происходят из водных бактерий, широко распространены в пресной и морской воде. Патогенные для человека виды относят к родам *Vibrio*, *Aeromonas* и *Plesiomonas*.

Для рода *Vibrio* характерны короткие прямые или изогнутые грамотрицательные палочки, подвижные, не образующие спор и капсул, хорошо растущие на обычных средах. Они ферментируют углеводы с образованием кислоты без газа. Можно культивировать при температуре от 18 до 37 °C, pH 8,6–9,0.

От других родов семейства представители рода *Vibrio* дифференцируют по биохимическим тестам. Род

насчитывает более 25 видов, из них основное значение имеет *Vibrio cholerae* — возбудитель холеры, а также *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*.

ПАТОГЕНЕЗ

Бактерии *V. parahaemolyticus* широко распространены в морских и прибрежных водах, но не все штаммы являются патогенными [4]. Штаммы, выделенные из проб окружающей среды, как правило, не имеют патологических генов, которые вызывают болезнь человека и морских животных [7, 14, 32]. Тем не менее, исследования в США, Европе и Азии показали, что примерно 6% из всех выделенных из окружающей среды и проанализированных штаммов *V. parahaemolyticus* были положительными на наличие генов термостабильного или термолабильного гемолизина [6, 9, 10, 17, 22].

Наиболее важным в бактериальном патогенезе является обязательное наличие клетки хозяина. Во время инфекции бактериальные факторы адгезии (поверхностные белки, обеспечивающие прикрепление бактерий к эпителию), присутствующие на поверхности бактерий, образуют контакт с клеткой хозяина для секреции эффекторов и токсичных белков. Характерным фактором адгезии, которая представлена у многих грамотрицательных бактерий, является MAM7 (поливалентная адгезивная молекула 7). MAM7 состоит из гидрофобного участка 44 аминокислот на N-конце, который необходим для правильной локализации и закрепления белка наружной мембраны. MAM7 также содержит 7 доменов для входа в клетки млекопитающих [37]. MAM7 постоянно экспрессируется, что позволяет грамотрицательным патогенам создать непосредственный контакт с клетками-хозяевами после их первого столкновения, которое, в свою очередь, приводит к адгезии на клетке хозяина и началу действия факторов вирулентности [19].

Штаммы *V. parahaemolyticus* имеют целый ряд вирулентных факторов, таких как термостабильный и термолабильный гемолизин (бактериальные токсины гемолиза и цитотоксичной деятельности в клетке хозяина), которые вызывают лизис инфицированной клетки хозяина и создают условия для освобождения важных питательных веществ [5, 12, 36].

Энтеротоксины (термолабильный и термостабильный), связываясь с эпителиальными клетками желудка и кишечника, воздействуют на ферментативные системы эпителиоцитов, не вызывая в этих органах морфологических изменений. Среди активизируемых токсинами ферментов — аденилатциклаза и гуанилатциклаза, повышающие образование в клетках слизистой оболочки биологически активных веществ — цАМФ и цГМФ. Под воздействием токсинов увеличивается скорость образования простагландинов, гистамина, кишечных гормонов и др. Все это приводит к повышению секреции жидкости и солей в просвет желудка и кишечника и развитию рвоты и поноса.

Цитотоксин повреждает мембраны эпителиальных клеток и нарушает в них белково-синтетические процессы. Это может увеличивать проницаемость кишечной стенки для различного рода токсичных веществ микробного происхождения, а в некоторых случаях и самих микробов. Все это приводит к развитию интоксикации, нарушению микроциркуляции и местным воспалительным процессам слизистой оболочки кишки.

Проникновение в желудок вместе с пищей не только самих микроорганизмов, но и большого количества

образованных ими токсинов обуславливает развитие самого короткого в инфекционной патологии инкубационного периода. Инкубационный период длится от 2 до 48 ч. Симптомы: диарея, рвота, боль в животе, резкий озноб, лихорадка, шок, поражения кожи.

Кратковременный характер течения инфекции связан с непродолжительным пребыванием возбудителей в организме человека. Действие токсинов, связывающихся с эпителиальными клетками желудка и кишечника, прекращается после десквамации этих клеток. Несвязанные молекулы токсина инактивируются протеазами.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Морепродукты богаты питательными веществами, потребление которых является частью здорового питания [11]. Примерно 90% мирового производства аквакультуры базируется в Азии. Однако, наряду с пищевыми выгодами от потребления морепродуктов, существуют потенциальные риски от употребления зараженных морепродуктов. Морепродукты известны как средство передачи бактерий, которые вызывают болезни человека во всем мире. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет пищевые отравления как болезнь, которая вызывается потреблением загрязненной пищи [2]. Было выявлено, что за крупные вспышки пищевых заболеваний во всем мире ответственные такие патогены, как *Vibrio* нескольких видов, *E. coli* O157:H7, кампилобактерии, сальмонеллы и листерии [2, 3]. В азиатском регионе *V. parahaemolyticus* была признана в качестве ведущей причины вспышек пищевых отравлений во многих странах, включая Японию, Индию, Китай, Тайвань [29], Корею [23] и Малайзию [1, 28].

В последнее время число вспышек увеличилось. Это особенно заметно в странах с высоким уровнем потребления морепродуктов, где *V. parahaemolyticus* вызывает более половины всех вспышек пищевых отравлений бактериального происхождения [35].

Эпидемиология этих бактерий изменилась с появлением пандемического клона серотипа O3:K6 в Калькутте, Индия, в 1996 г. [32]. С тех пор штаммы O3:K6 были причиной многих вспышек пищевых отравлений в азиатских странах, США и по всему миру [25]. В настоящее время существует более 20 серовариантов, в том числе O3:K6, O4:K68, O1:K25 и O1:Kут [7].

Патогенная *V. parahaemolyticus* также была выделена в Таиланде, который является основным производителем и экспортером креветок во всем мире. Недавнее исследование показало присутствие резистентного к противомикробным препаратам *V. parahaemolyticus* в креветках, которых разводят во внутренних водоемах Таиланда [26]. Патогенные и устойчивые к противомикробным препаратам *V. parahaemolyticus* также были выделены из креветок и мидий в Малайзии [6]. В последние годы *V. parahaemolyticus* занимает одно из ведущих мест в болезнях пищевого происхождения в Китае [33]. В литературе показано, что различные продукты на китайских рынках загрязнены различными пищевыми патогенами, такими как *L. monocitogenes* [33], *Salmonella spp.* [37], *Campylobacter jejuni* [28], а также *V. parahaemolyticus*.

В Индии *V. parahaemolyticus* была выделена как из клинических, так и из экологических проб. В недавнем клиническом исследовании было изолировано 178 штаммов *V. parahaemolyticus* от 13 607 пациентов

с признаками диареи, поступивших в инфекционную больницу Калькутты с 2001 по 2012 гг. [27].

L. Zhang и соавт. сообщили об обнаружении и выделении антибиотикоустойчивых штаммов *V. parahaemolyticus* в Южной Индии [37]. В другом исследовании патогенные и антибиотикоустойчивые штаммы были выделены из морепродуктов в индийском штате Керала, г. Кочин [26].

Появление патогенных антибиотикорезистентных штаммов *V. parahaemolyticus* ведет к проблемам общественного здравоохранения, которые требуют немедленного внимания. В Европе *V. parahaemolyticus* была изолирована из вод Балтийского, Северного, Средиземного [22] и Черного морей [1]. В 1978 г. были проведены исследования в прибрежных водах Гваделупы, где *V. parahaemolyticus* была выделена в 53 случаях из 100 исследованных проб [18]. Многочисленные случаи гастроэнтерита, вызываемого *V. parahaemolyticus*, были выявлены и описаны в Испании, Греции, Великобритании, Турции, Дании, Югославии и скандинавских странах [1, 2]. Серьезная вспышка, насчитывающая 44 заболевших, связанная с потреблением креветок, импортируемых из Азии, произошла во Франции в 1997 г. [22]. В 1999 г. из-за потребления сырых устриц в Испании заболело 64 человека [13], а в 2004 г. — 80 человек, употреблявших в пищу мяса краба [31].

В 1971 г. *V. parahaemolyticus* была впервые идентифицирована как пищевой патоген в штате Мэриленд (США) после трех вспышек гастроэнтеритов с общим числом заболевших 425 человек, связанных с потреблением неправильно приготовленных крабов. С тех пор перемежающиеся вспышки *V. parahaemolyticus* были зарегистрированы в прибрежных районах США из-за потребления ракообразных или сырых морепродуктов [35]. Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) за период с 1973 по 1998 гг. сообщил о 40 вспышках инфекции *V. parahaemolyticus* [15].

Ежегодно в США сообщается в среднем о 215 подтвержденных случаях заболевания *V. parahaemolyticus*, 30 случаях госпитализации и 1–2 смертей. Существует ряд проблем, связанных с постановкой лабораторного диагноза на *V. parahaemolyticus*, поэтому вполне вероятно, что многие случаи остаются незамеченными.

Для улучшения контроля инфекции, вызванной *V. parahaemolyticus*, с 2007 г. лаборатории США обязали уведомлять Государственный департамент здравоохранения и сообщать обо всех случаях в Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC). В 2012 г., по сравнению с 2006–2008 гг., отмечен рост заболеваемости *V. parahaemolyticus* на 43%. Так, на 100 тыс. человек зарегистрировано 193 случая заболевания, из которых 6 случаев с летальным исходом. Наиболее подвержены данному заболеванию лица старше 65 лет [15]. Эти данные подчеркивают необходимость целенаправленных действий по достижению безопасности пищевых продуктов.

Исследования показали, что экологические факторы играют огромную роль в эволюции некоторых патогенов. Распространенность и распределение *V. parahaemolyticus* зависят от нескольких факторов окружающей среды, включая температуру воды, концентрацию солей, наличие кислорода, взаимодействие с планктоном, наличие органического вещества в виде суспензии [6, 31].

Несмотря на успехи в области гигиены, дезинфекции в пищевой и перерабатывающей отрасли,

V. parahaemolyticus по-прежнему представляет угрозу для здоровья человека во всем мире.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

V. parahaemolyticus обитают в морской среде с высоким уровнем pH, поэтому селективные среды, используемые для данного патогена, часто готовят с pH 8,6–9,4, с добавлением 1–7% хлорида натрия (NaCl). В некоторых литературных источниках указано на необходимость добавления в селективные среды поверхностно-активных веществ, таких как додецилсульфат натрия, соли желчных кислот и антибиотик полимиксин В [8].

Управление по контролю за продуктами и лекарствами (США) рекомендовало использование щелочной пептонной воды (ЩПВ) в качестве бульона обогащения для всех видов *Vibrio*, в том числе *V. parahaemolyticus*. ЩПВ характеризуется высоким уровнем pH 8,5–9,0 и высокой концентрацией NaCl, который ингибирует рост других бактерий [10]. Кроме ЩПВ, в качестве бульона обогащения для всех видов *Vibrio* может быть использован бульон с полимиксином (SPB). Результаты исследований D. Caccarelli и соавт. показали более высокий процент выделения и идентификации патогенных штаммов *V. parahaemolyticus* из образцов морепродуктов с помощью SPB по сравнению с ЩПВ [8].

Для выделения и идентификации *V. parahaemolyticus* были разработаны различные селективные среды. Наиболее распространенной селективной средой является тиосульфатцитрат-бромтимоловый сахарозный агар (TCBS-агар), который широко используется не только для холерного вибриона, но и для других патогенных вибрионов, кроме *V. hollisae* [20]. TCBS-агар (pH 8,6) содержит бычью желчь (0,8%) и NaCl (1%), которые подавляют рост других сопутствующих грамположительных организмов. Основным его преимуществом является наличие диагностической системы сахараза-бромтимоловый синий, что позволяет отличать сахарозоположительные вибрионы, такие как холерные вибрионы, от других видов *Vibrio*. Типичные колонии *V. parahaemolyticus* на агаре TCBS растут в виде круглых непрозрачных, зеленого или голубого цвета колоний диаметром 2–3 мм [20].

В настоящее время во многих лабораториях для проведения испытаний образцов морепродуктов на наличие *V. parahaemolyticus* используется процедура по обогащению и выделению парагемолитических вибрионов на селективном агаре, предложенная Y. Nara-Kudo и соавт. [8, 20, 29, 33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс в области молекулярной биологии, позволяющий идентифицировать новые штаммы и находить их источники, привел к тому, что за последнее десятилетие исследователи описывают по крайней мере один новый вид *Vibrio* в год. Поэтому для создания эффективных мер контроля, направленных на снижение риска развития инфекции, вызванной *V. parahaemolyticus*, и для обеспечения безопасности пищевых продуктов, должны быть доступны эффективные аналитические методы для обнаружения парагемолитических вибрионов в пищевых продуктах и образцах окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety / L. Jaxsens, J. Kussaga,

P.A. Luning [et al.] // Int. J. Food Microbiology. — 2009. — Vol. 134. — P. 113–125.

2. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors / V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska [et al.] // Biotechnol. Adv. — 2010. — Vol. 28, № 2. — P. 232–254.

3. Apun K., Yusof A.M., Jugang K. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds // Int. J. Environ. Health Res. — 1999. — Vol. 9, № 4. — P. 285–292.

4. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010 / J. Velazquez-Roman, N. León-Sicairos, H. Flores-Villaseñor [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78, № 6. — P. 1794–1803.

5. Broberg C.A., Calder T.J., Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants // Microbes Infect. — 2011. — Vol. 12–13. — P. 992–1001.

6. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia / H.-C. Wong, S.-H. Liu, T.-K. Wang [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, № 9. — P. 3981–3986.

7. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium-PCR protocol with a conventional method for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains from environmental and clinical samples / A. Canizalez-Roman, H. Flores-Villaseñor, J. Zazueta-Beltran [et al.] // Can. J. Microbiol. — 2011. — Vol. 57, № 2. — P. 136–142.

8. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors / D. Caccarelli, N.A. Hasan, A. Huq, R.R. Colwell / Front. Cell. Infect. Microbiol. — 2013. — Vol. 3, № 12. — P. 1–9.

9. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan / M.J. Alam, K.I. Tomochika, S.I. Miyoshi, S. Shinoda // FEMS Microbiol. Lett. — 2002. — Vol. 208, № 1. — P. 83–87.

10. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998) / A. DePaola, C.A. Kaysner, J. Bowers, D.W. Cook // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, № 11. — P. 4649–4654.

11. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States / M. Iwamoto, T. Ayers, B.E. Mahon, D.L. Swerdlow // Clin. Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 23, № 2. — P. 399–411.

12. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae* / K. Makino, K. Oshima, K. Kurokawa [et al.] // Lancet. — 2003. — Vol. 361, № 9359. — P. 743–739.

13. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants / G.B. Nair, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 20, № 1. — P. 39–48.

14. Gutierrez West C.K., Klein S.L., Lovell C.R. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79, № 7. — P. 2247–2252.

15. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 1996–2012 / Centers for Disease Control and Prevention // Morbidity and Mortality Weekly Report. — 2013. — Vol. 62, № 15. — P. 283–287.

16. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems /

- A. Newton, M. Kendall, D.J. Vugia [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 54, № 5. — P. 391–395.
17. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand / V. Vuddhakul, A. Chowdhury, V. Lao-haprertthisan [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, № 6. — P. 2685–2689.
18. Kaneko T., Colwell R.R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay // J. Bacteriol. — 1973. — Vol. 113, № 1. — P. 24–32.
19. Krachler A.M., Orth K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286, № 45. — P. 38939–38947.
20. McCarter L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — Vol. 1, № 1. — P. 51–57.
21. Nelapati S., Nelapati K., Chinnam B.K. *Vibrio parahaemolyticus* — An emerging foodborne pathogen — A Review // Vet. World. — 2012. — Vol. 5, № 1. — P. 48–62.
22. Occurrence of pathogenic *Vibrio* in coastal areas of France / D. Hervio-Heath, R.R. Colwell, A. Derrien [et al.] // J. Appl. Microbiol. — 2002. — Vol. 92, № 6. — P. 1123–1135.
23. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets / J.-K. Lee, D.-W. Jung, S.-Y. Eom [et al.] // Food Control. — 2008. — Vol. 19, № 10. — P. 990–994.
24. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning / T. Fujino, Y. Okuno, D. Nahada [et al.] // Med. J. Osaka Univ. — 1953. — Vol. 4. — P. 299–304.
25. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses / C. Matsumoto, J. Okuda, M. Ishibashi [et al.] // Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38, № 2. — P. 578–585.
26. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand / Y. Yano, K. Hamano, M. Satomi [et al.] // Food Control. — 2014. — Vol. 38. — P. 30–36.
27. Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the North Western Province of Sri Lanka / M.S. Koralage, T. Alter, D. Pichpol [et al.] // J. Food Prot. — 2012. — Vol. 75, № 10. — P. 1846–1850.
28. Prevalence and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in raw salad vegetables at retail level / R. Tunung, S. Margaret, P. Jeyaletchumi [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 20, № 2. — P. 391–396.
29. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in sea food and the coastal environment in Japan / Y. Hara-Kudo, K. Sugiyama, M. Nishibuchi [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69, № 7. — P. 3883–3891.
30. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan / W.T. Yu, K.J. Jong, Y.R. Lin [et al.] // Int. J. Food Microbiol. — 2013. — Vol. 160, № 3. — P. 185–192.
31. Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus* / M. Zarei, M.P. Borujeni, A. Jamnejad, M. Khezrzadeh // Food Control. — 2012. — Vol. 25, № 1. — P. 107–109.
32. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India / A. Deepanjali, H.S. Kumar, I. Karunasagar, I. Karunasagar // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71, № 7. — P. 3575–3580.
33. Su Y.C., Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety // Food Microbiol. — 2007. — Vol. 24, № 6. P. 549–558.
34. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence / C.J. Gode-Potratz, R.J. Kustusch, P.J. Breheny [et al.] // Mol. Microbiol. — 2011. — Vol. 79, № 1. — P. 240–263.
35. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998 / N.A. Daniels, L. MacKinnon, R. Bishop [et al.] // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 181, №5. — P. 1661–1666.
36. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis / D.L. Burdette, M.L. Yarbrough, A. Orvedahl [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, № 34. — P. 12497–12502.
37. Zhang L., Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection // Curr. Opin. Microbiol. — 2013. — Vol. 16, № 1 — P. 70–77.

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 страниц – но не менее 5 (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 источник 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 «ВНИИЗЖ» образовано в 1958 г. как Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИЯИ). Сегодня учреждение является уникальным, признанным во всем мире Центром по решению проблем здоровья животных.

ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРА В ОБЛАСТИ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА ЯВЛЯЮТСЯ:

– деятельность по разработке и производству высокоэффективных диагностических и лекарственных средств для КРС.

ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ:

ВАКЦИНЫ:

- против болезней КРС: парагрипп-3, ротавирусная инфекция, коронавирусная инфекция, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея;
- против ящура всех типов;
- против болезней МРС: чума мелких жвачных, оспа овец.

ДИАГНОСТИКУМЫ:

- на ящур.
- изучение антигенных свойств эпизоотических изолятов вируса ящура и возбудителей других особо опасных инфекций;
- разработка биологических методов выделения и иммунохимических методов идентификации эпизоотических изолятов возбудителей ящура и других особо опасных болезней;
- разработка методов дифференциальной диагностики ящура и других вирусных болезней животных от клинически сходных болезней иной этиологии;
- диагностические исследования по обнаружению генома, проведение серологических исследований,

изучение биологических свойств возбудителей болезни Шмалленберг и блютанга;

- мониторинговые и скрининговые исследования инфекционных болезней жвачных животных, ретроспективная диагностика основных экономически значимых болезней (вирусная диарея КРС, инфекционный ринотрахеит КРС, парагрипп-3, рота- и коронавирусные инфекции КРС, лейкоз, респираторно-синцитиальная инфекция и др.);
- разработка и совершенствование методов диагностики, комплексное изучение биологических свойств вирусов (изолятов);
- обнаружение и идентификация возбудителей инфекционных болезней жвачных животных с использованием вирусологических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики;
- лабораторная диагностика губкообразной энцефалопатии КРС (ГЭ) и медленных инфекций МРС;
- прогнозирование и оценка рисков возникновения и заноса ГЭ КРС, определение порядка действия при возникновении ГЭ КРС.

Важным аспектом деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» является оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам лабораторий и животноводческих предприятий, разработка мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней крупного рогатого скота. Ученые Центра ведут научное сопровождение продукции ФГБУ «ВНИИЗЖ»



и непрерывную консультационную деятельность в хозяйствах.

Учреждение осуществляет подготовку научных кадров—аспирантов и соискателей, обучение специалистов, стажеров и практикантов, а также проводит курсы повышения квалификации по вопросам диагностики, профилактики и мерам борьбы с инфекционными болезнями жвачных животных.

Контакты:

Почтовый адрес: Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Сектор продаж ветпрепаратов на территории РФ: тел. (4922) 26–15–25, 26–15–51, 52–99–24

Сектор экспорта и импорта ветпрепаратов: тел. (4922) 26–18–56

Отдел маркетинга и рекламы: тел. (4922) 26-15-12, 26-19-88, 26-17-65 (доб. 24-34)

сайт: <http://www.arriah.ru>

канал на Youtube: <https://www.youtube.com/channel/UCVPBOvjLZcxbEmJ1Qw3YYcw>