

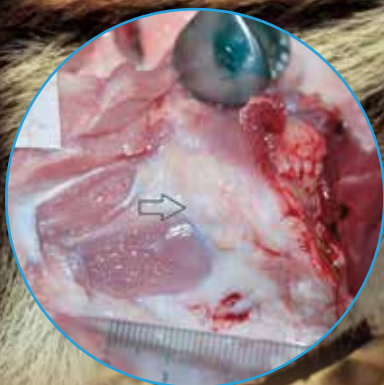
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ  
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)  
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ  
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

# ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ  
ЖУРНАЛ

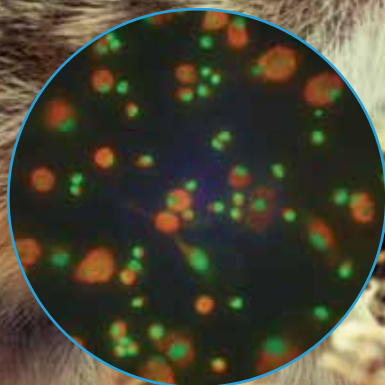
## VETERINARY TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



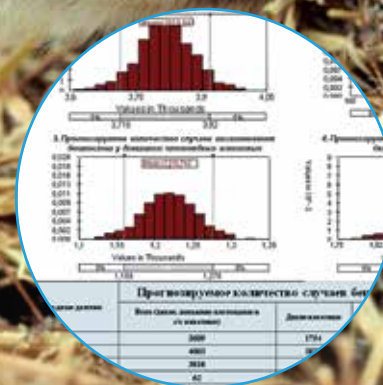
**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ  
ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-  
РЕСПИРАТОРНОГО  
СИНДРОМА СВИНЕЙ**  
стр. 16

**IMPROVEMENT OF INACTIVATED  
VACCINE AGAINST PORCINE  
REPRODUCTIVE RESPIRATORY  
SYNDROME**  
p. 20



**ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ  
ВИРУСА АЧС НА ПЕРВИЧНОЙ  
КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО  
МОЗГА СВИНЕЙ ДО И ПОСЛЕ  
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ**  
стр. 7

**STUDY OF ASF VIRUS  
REPRODUCTION IN PORCINE  
PRIMARY BONE MARROW CELL  
CULTURE BEFORE AND AFTER  
CRYOPRESERVATION**  
p. 12



**РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ  
ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ  
ПО БЕШЕНСТВУ ЖИВОТНЫХ  
НА ТЕРРИТОРИИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
стр. 64

**RETROSPECTIVE  
ANALYSIS OF RABIES  
EPIZOOTIC SITUATION  
IN ANIMALS IN THE TERRITORY  
OF THE RUSSIAN FEDERATION**  
p. 64

Журнал «Ветеринария сегодня»  
включен в Перечень рецензируемых  
научных изданий (ВАК)



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



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

- Референтная лаборатория по бешенству в РФ
- Референтная лаборатория по гриппу и ньюкаслской болезни птиц в РФ
- Испытательный центр
- Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»:
- Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья
- Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру
- Референтный центр FAO по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

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

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

## Ветеринария сегодня №1 (16) 2016 научный журнал



**Главный редактор:**  
Лозовой Дмитрий Анатольевич – кандидат ветеринарных наук, директор 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;



**Василевич Ф.И.** – ректор Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, доктор ветеринарных наук, академик РАН, профессор кафедры паразитологии и инвазионных болезней животных;



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



**Груздев К.Н.** – доктор биологических наук, профессор, 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, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



**Красочко П.А.** – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 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.Г.** – 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 ФГБУ ВНИИТБП, г. Щелково;



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



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



**Шахов А.Г.** – член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, ГНУ ВНИИВФит 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. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Типография:** ООО «Юнион Принт», 603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: (831) 439-44-99

Подписано в печать 02 марта 2016 года

Дата выхода 09.03.2016



## СОДЕРЖАНИЕ

### НОВОСТИ

**6** Получение Федеральным центром охраны здоровья животных сертификата GMP  
Обучение ветеринарных специалистов Киргизии

### БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

**7** И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, Н.Н. Власова, А.А. Варенцова, Б.Л. Манин, О.С. Пузанкова, В.Л. Гаврилова, А.С. Иголкин  
Изучение репродукции вируса африканской чумы свиней на первичной культуре клеток костного мозга свиней до и после криоконсервирования

**16** Д.А. Бирюченков, Е.П. Баборенко, Е.А. Авситидийский, Д.Л. Долгов, Ж.Ю. Мурадян, А.И. Албулов  
Совершенствование инактивированной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней

**24** А.В. Потехин, В.С. Русалеев  
Мониторинг антибиотикорезистентности изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012–2014 гг.

### ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

**30** А.А. Луговской, Д.С. Большаков, Т.Б. Никешина  
Разработка и валидация методики определения антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

### БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**38** Д.А. Лозовой, А.М. Рахманов  
Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в 2013–2015 гг. и меры борьбы с ним

**43** С.В. Кононова, О.П. Бьядовская, А.А. Нестеров, И.Н. Шумилова, А.В. Кононов  
Выявление специфических антител к вирусу болезни Шмалленберг в реакции микронеutralизации

**46** Г.Л. Багиян  
Оценка результативности оздоровительных мероприятий неблагополучных по бруцеллезу хозяйств в современных условиях Республики Армения

### БОЛЕЗНИ ПТИЦ

**51** В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, М.А. Циванюк, И.А. Чвала  
Изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1

**55** А.А. Козлов, Н.Г. Зиняков, С.Н. Колосов, Н.С. Мудрак, И.А. Чвала  
Анализ последовательности полного генома штамма «О» вируса инфекционного ларинготрахеита птиц

**59** О.С. Осипова, М.А. Волкова, Н.Г. Зиняков, С.П. Лазарева, В.Ю. Сосипаторова, И.А. Чвала  
Характеристика изолята аденовируса птиц FAdV4/6/2009

### БЕШЕНСТВО

**64** А.В. Бельчихина, А.К. Караулов  
Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации

## CONTENTS

### SWINE DISEASE

**12** I.Yu. Zhukov, I.V. Shevchenko, N.N. Vlasova, A.A. Varentsova, B.L. Manin, O.S. Puzankova, V.L. Gavrilova, A.S. Igolkin  
Study of african swine fever virus reproduction in porcine primary bone marrow cell culture before and after cryopreservation

**20** D.A. Biruchenkov, Ye.P. Baborenko, Ye.A. Avsitidiyskiy, D.L. Dolgov, Zh.Yu. Muradyan, A.I. Albulov  
Improvement of inactivated vaccine against porcine reproductive respiratory syndrome

**27** A.V. Potekhin, V.S. Rusaleyev  
Monitoring of antibiotic resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Russian Federation in 2012–2014

### FOOD SAFETY

**30** A.A. Lugovskoy, D.S. Bolshakov, T.B. Nikeshina  
Development and validation of fluoroquinolone detection method in chicken eggs using high-performance liquid chromatography

### CATTLE DISEASE

**38** D.A. Lozovoy, A.M. Rakhmanov  
Global FMD epidemic situation in 2013-2015 and FMD control measures

**43** S.V. Kononova, O.P. Byadovskaya, A.A. Nesterov, I.N. Shumilova, A.V. Kononov  
Detection of specific antibodies to Schmallenberg virus using microneutralisation test

**46** G.L. Bagiyani  
Assessing effectiveness of corrective measures taken on brucellosis-affected farms in modern Armenia

### AVIAN DISEASES

**51** V.Yu. Sosipatorova, D.A. Altunin, M.A. Tsivanyuk, I.A. Chvala  
Examination of pathological process peculiarities caused by A/duck/Altai/469/14 H5N1 isolate of avian influenza virus in chickens

**55** A.A. Kozlov, N.G. Zinyakov, S.N. Kolosov, N.S. Mudrak, I.A. Chvala  
Analysis of whole genome sequence of strain “O” of avian infectious laryngotracheitis virus

**59** O.S. Osipova, M.A. Volkova, N.G. Zinyakov, S.P. Lazareva, V.Yu. Sosipatorova, I.A. Chvala  
Characterization of avian adenovirus FAdV-4/6/2009 isolate

### RABIES

**64** A.V. Belchihina, A.K. Karaulov  
Retrospective analysis of rabies epizootic situation in animals in the territory of the Russian Federation



## ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

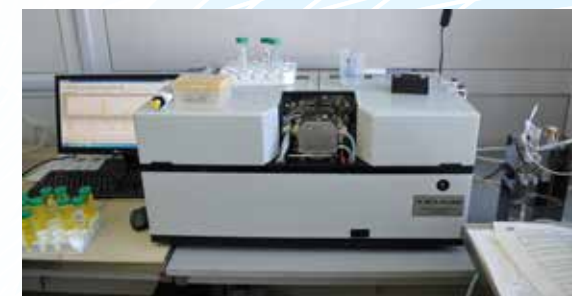
ФГБУ «ВНИИЗЖ» осуществляет подготовку научно-педагогических кадров в аспирантуре по двум направлениям:

**06.06.01 Биологические науки**, специальность 03.02.02 Вирусология

**36.06.01 Ветеринария и зоотехния**, специальность 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Прием документов на обучение начинается ежегодно с 01 июня и завершается за две недели до начала вступительных испытаний 01 сентября текущего года.

Подробная информация о приеме в аспирантуру размещена на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» [www.ariah.ru](http://www.ariah.ru) в разделе «Образование».



Аспиранты участвуют в региональных, всероссийских и международных научных конференциях, проходят стажировки в ведущих научных центрах России и за рубежом.

Аспиранты, обучающиеся в очной аспирантуре, обеспечиваются стипендией в установленном размере, иногородним предоставляется жилье.



В ФГБУ «ВНИИЗЖ» работают высококвалифицированные специалисты (доктора и кандидаты наук), имеющие глубокую теоретическую подготовку и научный потенциал.

Лаборатории института оснащены современным научным оборудованием, необходимым для выполнения диссертационных работ.



(МЭБ) Всемирная организация охраны здоровья животных



Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

Наш адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec  
Тел./факс: (4922) 52-99-62  
Тел.: (4922) 26-15-12 (доп. 22-20)  
[www.ariah.ru](http://www.ariah.ru)



# ПОЛУЧЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНЫМ ЦЕНТРОМ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ СЕРТИФИКАТА GMP

Международный стандарт GMP — это один из основных стандартов, который регламентирует требования к осуществлению производственной деятельности по выпуску лекарственных препаратов и контролю за их качеством.

В августе–сентябре 2015 года в подведомственном Россельхознадзору ФГБУ «ВНИИЗЖ» был осуществлен сертификационный аудит на соответствие требованиям GMP ЕС (надлежащей производственной практики Европейского союза).

15 декабря 2015 года ФГБУ «ВНИИЗЖ» был получен сертификат GMP № ARRO10915, выданный GA PHARMA CONSULTING, на соответствие требованиям «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» Европейского союза. Настоящий сертификат подтверждает, что лекарственные средства для ветеринарного применения, производимые ФГБУ «ВНИИЗЖ», соответствуют EudraLex, «Том 4. Руководство ЕС по надлежащей практике производства лекарственных препаратов для человека и животных», изданного в соответствии с Директивой 2003/94/ЕС.

Для крупнейшего национального производителя иммунобиологических лекарственных средств

ФГБУ «ВНИИЗЖ» выполнение требований GMP дает определенное конкурентное преимущество на рынке лекарств, но также влечет за собой значительное увеличение затрат на техническое и технологическое перевооружение, изменение системы организации производства и контроля лекарственных средств.

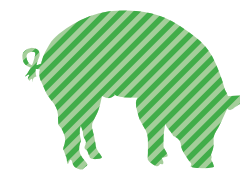


# ОБУЧЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ КИРГИЗИИ

В соответствии с соглашением между Правительством Российской Федерации и Правительством Кыргызской Республики с 14 по 25 декабря 2015

года на базе подведомственного Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» прошло обучение специалистов ветеринарной службы Кыргызской Республики по вопросам эпизоотологии и анализу риска в ветеринарной практике, пищевой биобезопасности, лабораторной диагностики инфекционных болезней животных, в том числе таких особо опасных, как ящур, африканская и классическая чума свиней, высокопатогенный грипп птиц, они ознакомились с нормативно-правовыми актами Евразийского экономического союза (Таможенного союза). К чтению лекций и проведению практических занятий были привлечены ведущие сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также главный эксперт ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (Россельхознадзор, г. Москва).

В конце занятий был проведен круглый стол, слушатели получили комплекты современной научно-методической литературы по тематике, им вручили документы об успешном прохождении обучения.



## БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 619:578.842.1:57.082.26

# ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ НА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

И.Ю. Жуков<sup>1</sup>, И.В. Шевченко<sup>2</sup>, Н.Н. Власова<sup>3</sup>, А.А. Варенцова<sup>4</sup>, Б.Л. Манин<sup>5</sup>, О.С. Пузанкова<sup>6</sup>, В.Л. Гаврилова<sup>7</sup>, А.С. Иголкин<sup>8</sup>

<sup>1</sup> ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhukov@arriah.ru

<sup>2</sup> ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko@arriah.ru

<sup>3</sup> главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: vlasova\_nn@arriah.ru

<sup>4</sup> младший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: varentsova@arriah.ru

<sup>5</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: puzankova@arriah.ru

<sup>7</sup> научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gavrilova\_vl@arriah.ru

<sup>8</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin\_as@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В настоящей работе приводятся данные по получению клеток костного мозга свиней, селезенки свиней, лимфатических узлов, свиной почки, тестикул свиней, используемых для репродукции вируса африканской чумы свиней. Изучение сохранности клеток при криоконсервировании проводили только с культурой клеток костного мозга свиней. Замораживание и хранение проводили при -70, -150 и -196°C. В качестве криопротектора применяли диметилсульфоксид в концентрации 10% с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. После размораживания клеток и освобождения от криопротектора для предотвращения агрегации клеток добавляли 10 МЕ/мл гепарина натрия. Самые высокие гемадсорбирующие титры были получены при культивировании вируса африканской чумы свиней на культуре клеток костного мозга свиней, хранившейся при температуре -150 и -196°C в течение 5–6 месяцев, они составляли  $5,76 \pm 0,25 \text{ Ig ГАД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$  и  $(4,66-4,87) \pm 0,25 \text{ Ig ГАД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$  соответственно. Клетки костного мозга свиней сохраняли свою жизнеспособность только в течение 4 месяцев хранения при -70°C и после размораживания были способны поддерживать репродукцию вируса на уровне  $(3,2-3,86) \pm 0,25 \text{ Ig ГАД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ .

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, культура клеток костного мозга свиней, гемадсорбирующий титр вируса.

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозное вирусное заболевание свиней, характеризующееся явлениями острого токсикоза, геморрагическим диатезом и заканчивающееся почти всегда летальным исходом [6]. Болезнь ранее регистрировали в Африке, Испании, Португалии, Франции, Бразилии и на Кубе. Из ранга эпизоотий данное заболевание переходит по некоторым параметрам в панзоотию [1, 2].

Экономический ущерб для свиноводства при заносе и дальнейшем распространении вируса АЧС огромен [8]. Достоверная и своевременная постановка диагноза является основным звеном в мероприятиях по предотвращению дальнейшего распространения инфекции [10].

Для диагностики АЧС используют клеточные системы, полученные *in vitro* от чувствительных к данному заболеванию животных (*Sus scrofa*). К ним относятся клетки, полученные как из органов (свиной почки, тестикул свиней), так и из клеток кроветворной системы (клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки свиней) [6, 8]. Все перечисленные первичные клеточные культуры по-разному чувствительны к вирусу АЧС, поэтому не все клетки принимают участие в репродукции

вируса. Но методически правильное получение этих систем делает их незаменимым звеном в исследованиях. Кроме первичных культур клеток для диагностики и выделения вируса АЧС можно использовать перевиваемые линии клеток, полученные от разных животных, включая обезьян (Vero-V, CV-1). Но предпочтение отдается гомологичным объектам и самым чувствительным клеткам [11–15].

Получение свежих клеток костного мозга и других первичных объектов является трудоемким процессом, поэтому была предпринята попытка изучения условий хранения суспензий клеток при низких и сверхнизких температурах и их влияния на репродукцию вируса АЧС после размораживания.

В медицинской науке и практике криоконсервирование клеток костного мозга активно применяется при трансплантации различных патологий [5]. В фундаментальных работах были отработаны основные методические подходы к данной проблеме. Был определен широкий спектр используемых для криоконсервирования клеток криопротекторов: ПЭО-400, этиленгликоль, ДМСО и др. [3]. Известно, что скорость замораживания клеток костного мозга после кристаллизации должна быть очень высокой для предотвращения внутриклеточной кристаллизации, что было учтено в данной работе.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали поросят 2–4-месячного возраста массой 15–30 кг, полученных из хозяйств Владимирской области, благополучных по инфекционным болезням.

После декапитации поросят проводили изолирование трубчатых костей для получения культур клеток костного мозга свиней (КК КМС) [4, 7, 9] и стерильно изымали селезенку, тестикулы, лимфоузлы, почки [1]. Клетки тщательно измельчали, заливали физиологическим раствором с добавлением антибиотиков: бензилпенициллина калиевой/натриевой соли, стрептомицина, цефотаксима, гентамицина, метронидазола. Для трипсинизации брали 0,25% раствор трипсина для свиной почки (СП). Для лучшего вымывания суспензию клеток встряхивали на термошейкере при t=37°C в течение 30 мин. Надосадок сливали в стерильную емкость с фетальной сывороткой крупного рогатого скота (ФС КРС, 10% от основного состава). К осадку добавляли свежую порцию 0,25% раствора трипсина для СП, вновь встряхивали на термошейкере вышеуказанным способом, и полученный надосадок объединяли в одной емкости, фильтровали через марлю и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Получившийся осадок ресуспендировали в среде с добавлением гепарина натрия 10 МЕ/мл, который способствовал разделению конгломератов на отдельные клетки. Затем, для освобождения от гепарина натрия, снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в среде, фильтровали через фильтр Cell Strainer фирмы SDL с диаметром пор 70 мкм, разводили до необходимой концентрации. Для посева культур клеток использовали питательные среды Игла, ПСП, DMEM/F-12, содержащие 20% ФС КРС. Подсчет клеток проводили как с использованием стандартных прикладных методов (подсчет в камере Горяева), так и в автоматическом счетчике клеток Countess™ (Invitrogen™, Корея). Первичные культуры клеток вносили в пластиковые

96-луночные планшеты, пластиковые флаконы площадью 25 см². Культивировали культуры клеток в CO₂-инкубаторе с содержанием 5% CO₂.

Трипсинизацию костного мозга свиней проводили подобным образом, но вместо 0,25% раствора трипсина использовали смесь растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в соотношении 1:5 в объеме 50 мл на 450 мл среды Игла.

Для постановки реакции гемадсорбции вируса АЧС готовили рабочую суспензию эритроцитов свиньи. Для этого отбирали 200 мл крови у поросенка в стерильный флакон со стеклянными бусинами, который встряхивали в течение 30 мин на шуттель-аппарате до образования фибриновых сгустков. Затем кровь фильтровали через воронку со стерильной 4-слойной марлей. Отфильтрованную кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10–15 мин для отделения сыворотки, которую затем отбирали в отдельный флакон. Осадок эритроцитов трижды промывали физиологическим раствором (по 50 мл) и вновь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10–15 мин. Оставшиеся в осадке эритроциты разводили физиологическим раствором 1:10 и получали матровую (основную) суспензию. К полученной суспензии добавляли 50 мкл/мл гентамицина и хранили 1 мес. при t=4°C. Из матровой делали рабочую суспензию эритроцитов. Для этого брали 1 мл суспензии и добавляли 9 мл физиологического раствора.

В данной работе КК КМС инфицировали изолятом Одинцово 02/14 вируса АЧС в дозе 0,1–0,01 ГАД<sub>E50</sub>/кл.

В качестве криопротекторов применяли диметилсульфоксид (ДМСО) [3] в концентрации 10%, а также добавляли 10% ФС КРС. Суспензию КК КМС в концентрации 5,0×10<sup>6</sup> кл./см³ фасовали в пластиковые пробирки в объеме 5,0 мл и хранили в течение 6 мес. при температуре -70, -150 и -196°C в жидком азоте в сосуде Дьюара. После 1, 2, 3, 4, 5, 6 мес. хранения КК КМС размораживали при комнатной температуре и разводили в среде Игла. Затем суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 мин. Удаляли надосадок, осадок растворяли в среде Игла, подсчитывали общее количество клеток и процент выживших, которые высевали в 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку. Через 48 ч без смены среды КК КМС заражали вирусом АЧС. Гемадсорбирующую активность вируса АЧС в КК КМС учитывали на 5–7 сутки.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Клетки, полученные из разных органов (костного мозга, селезенки, тестикул, почки, лимфатических узлов), обладают разными размерами и полиморфизмом, поэтому была проведена работа по подбору концентрации клеток для получения конфлюэнтного (сомкнутого) слоя для проведения полноценных вирусологических работ.

В процессе получения суспензии клеток КМС использовали гепарин натрия 10 МЕ/мл, встряхивали на шейкере при t=37°C в течение 30 мин для предотвращения агрегации кровяных клеток при замораживании. Подобным образом обрабатывали гепарином натрия и другие культуры клеток: селезенки свиней (СС), лимфатических узлов (ЛУ), тестикул свиней (ТС), свиной почки (СП).

Посев производили в матрасы площадью 25 см² и в лунки 96-луночных планшетов. Посевная концентрация клеток и вносимый объем представлены в табл. 1.

**Таблица 1**  
Скрининг (подбор) концентрации клеток для получения конфлюэнтного монослоя во флаконах площадью 25 см² и в 96-луночных планшетах

Культура клеток	Концентрация клеток в 1 мл	Объем клеточной суспензии, вносимый	
		в матрасы (S=25 см²)	в 96-луночные планшеты
КМС	6–8 млн	10 мл	100 мкл
СП	500 тыс.		
ЛУ	6–8 млн		
СС	6 млн		
ТС	500 тыс. – 2 млн		

Согласно полученным в экспериментах данным (табл. 1), наибольшая концентрация клеток необходима для посева клеток КМС, ЛУ и клеток СС. Для получения сплошного клеточного монослоя клеток СП требуется в четыре раза меньше, а концентрация клеток ТС может варьировать от 500 тыс. до 2 млн. В экспериментах клеточный монослой выросал при этих концентрациях через 24–72 ч. Инокулируемый объем клеточной суспензии не зависел от вида клеточной суспензии и составлял 10 мл во флакон S=25 см² и 100 мкл в одну лунку 96-луночного планшета. В матрасах и лунках планшетов с клетками КМС меняли питательную среду через 48 ч, а среду Игла в матрасах с клетками СС, ЛУ, ТС и СП меняли через 48–72 ч. Среда Игла также содержала 20% ФС КРС.

Монослой КК КМС инфицировали изолятом Одинцово 02/14 вируса АЧС в дозе 0,1–0,01 ГАД<sub>E50</sub>/кл. Титрование вируса АЧС, полученного через 5–7 суток после инфицирования, проводили в 96-луночных планшетах [4]. Титры вируса АЧС составляли в пределах от 6,5 до 7,0±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³.

Затем проверяли чувствительность к вирусу АЧС клеток КМС, хранившихся в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 мес. при температурах -70, -150 и -196°C. Суспензию клеток освобождали от консерванта путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в среде, подсчитывали количество и процент выживших клеток, который высевали в 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку. Через 48 ч КК КМС заражали вирусом АЧС. Гемадсорбирующую активность вируса АЧС учитывали на 5–7 сутки. Результаты репродукции вируса АЧС на КК КМС при трех температурах хранения показаны в табл. 2–4.

Результаты экспериментов (табл. 2) показали, что количество живых клеток КМС после размораживания при хранении в течение 5–6 мес. при -70°C равно 0. При хранении в течение 1–4 мес. процент живых клеток колебался от 57 до 7%. Гемадсорбирующий титр вируса АЧС на КК КМС составлял в пределах от 3,2±0,25 до 3,86±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³.

Как видно из результатов табл. 3, процент живых клеток по мере увеличения сроков хранения КК КМС при t=-150°C снижался с 95 до 37%, при этом гемадсорбирующий титр вируса АЧС составлял 5,76±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³.

По полученным данным (табл. 4) определено, что при хранении при -196°C количество живых клеток в процентном отношении существенно не менялось в течение 6 мес. и составляло от 72 до 89%. Количе-

ство клеток после размораживания было в пределах от 1,7×10<sup>6</sup> до 1,3×10<sup>6</sup> кл./см³. Гемадсорбирующий титр составлял от 4,66±0,25 до 4,87±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³.

В результате проведенных исследований выяснили, что концентрация клеток при первоначальном замораживании клеточной суспензии составляла 5,0×10<sup>6</sup> кл./см³, а уже через месяц количество клеток снизилось в 3 раза и оставалось на этом уровне в течение всего срока наблюдения.

Следовательно, при закладывании на хранение КК КМС при температуре -196°C необходимо брать максимально возможную концентрацию клеток.

Из табл. 2–4 видно, что, независимо от температуры хранения, клетки КМС образовывали монослой в лунках планшетов, достаточный для титрования вируса АЧС. Гемадсорбирующий титр вируса АЧС на КК КМС, полученный при посеве клеток, хранившихся при -150°C, составлял 5,76±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³. Процент сохранности клеток при -196°C был такой же высокий, как и при хранении при -150°C, но титр вируса снижался до (4,66–4,87)±0,25 Ig ГАД<sub>E50</sub>/0,15 см³.

В дальнейших наших исследованиях по изучению морфологии клеток КМС с помощью люминесцентной

**Таблица 2**  
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -70°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, Lg ГАД <sub>E50</sub> /0,15 см³
1	4,5×10 <sup>6</sup>	57	(3,2–3,86)±0,25
2	4,3×10 <sup>6</sup>	30	
3	4,3×10 <sup>6</sup>	28	
4	3,2×10 <sup>6</sup>	7	
5	2,8×10 <sup>6</sup>	0	
6	2,0×10 <sup>6</sup>	0	

**Таблица 3**  
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -150°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, Lg ГАД <sub>E50</sub> /0,15 см³
1	4,4×10 <sup>6</sup>	95	5,76±0,25
2	4,2×10 <sup>6</sup>	94	
3	3,2×10 <sup>6</sup>	91	
4	4,1×10 <sup>6</sup>	54	
5	4,4×10 <sup>6</sup>	39	
6	3,0×10 <sup>6</sup>	37	

**Таблица 4**  
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -196°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, Lg ГАД <sub>E50</sub> /0,15 см³
1	1,7×10 <sup>6</sup>	89	(4,66–4,87)±0,25
2	1,7×10 <sup>6</sup>	85	
3	1,6×10 <sup>6</sup>	82	
4	1,3×10 <sup>6</sup>	80	
5	1,4×10 <sup>6</sup>	80	
6	1,4×10 <sup>6</sup>	72	



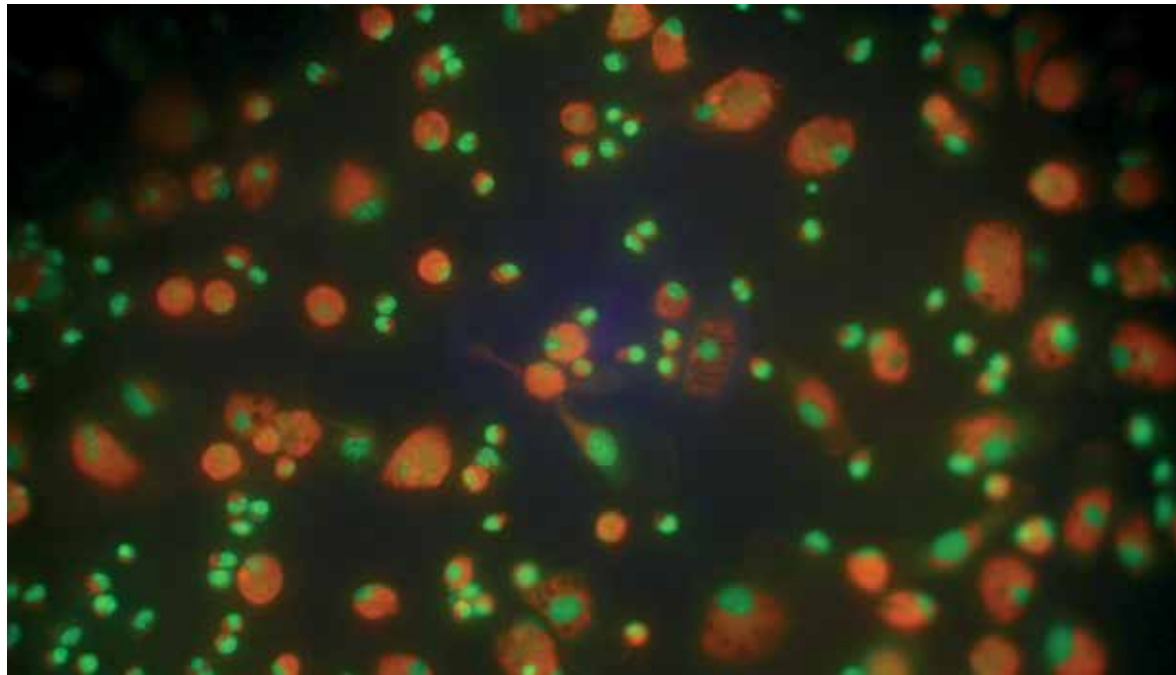


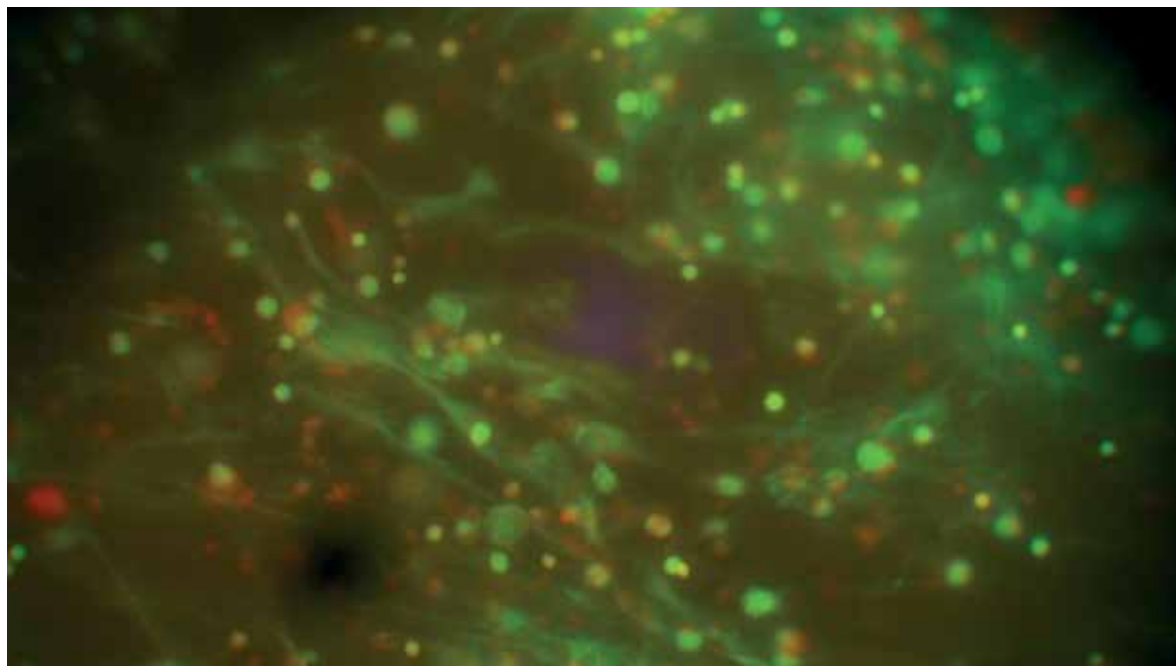
Рис. 1. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 24 ч после посева

микроскопии (окуляр  $\times 10$ ; объектив  $\times 60$ ) был выявлен полиморфизм клеток.

На рис. 1 видно, что в препарате находилось 2 типа клеток: мелкие с зелёными ядрами — это клетки костного мозга, крупные адгезированные — стромальные клетки.

После хранения КК КМС при  $-196^\circ\text{C}$  (рис. 2) в течение 3 мес. количество стромальных клеток стало меньше, большое количество мелких кровяных клеток костного мозга свиней с зелёными ядрами оказалось среди волокон внеклеточного матрикса.

Рис. 2. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 3 мес. хранения при  $-196^\circ\text{C}$  в жидком азоте



После 6 мес. хранения клеточной суспензии КМС в жидком азоте при  $-196^\circ\text{C}$  выживаемость клеток была достаточно высокой — 72% живых клеток (рис. 3).

Следовательно, адгезивная способность стромальных клеток при длительном хранении (срок наблюдения — 6 мес.) снижается меньше, чем кровяных клеток КМС.

### Выводы

1. В результате экспериментов установлено, что при получении суспензии клеток КМС, КС, ЛУ добавление 10 МЕ/мл гепарина натрия предотвращает их агрегацию. После встряхивания на термощейкере при  $t=37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в поле зрения микроскопа

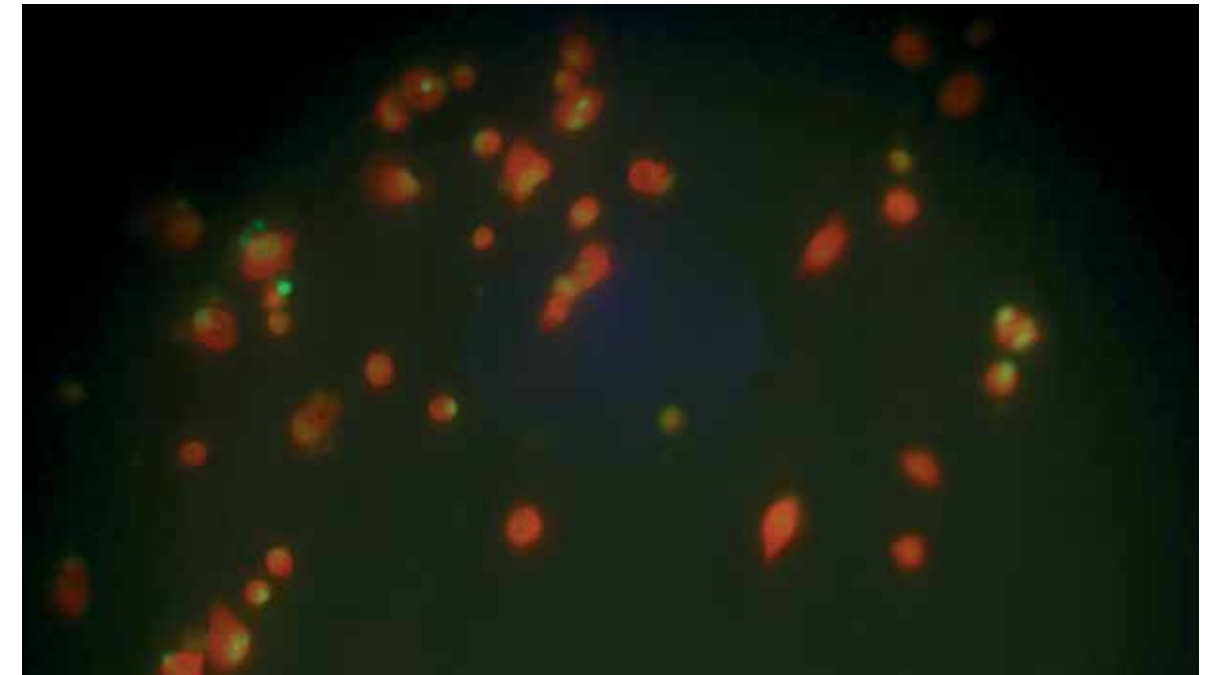


Рис. 3. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 6 мес. хранения при  $-196^\circ\text{C}$  в жидком азоте

наблюдается не более 1–2 конгломератов (увеличение  $1\times 10$ ).

2. Культура клеток КМС лучше всего сохранялась при температуре  $-150$  и  $-196^\circ\text{C}$  в течение 5–6 мес., гемадсорбирующие титры вируса АЧС при этом составляли  $5,76\pm 0,25 \text{ Ig ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$  и  $(4,66-4,87)\pm 0,25 \text{ Ig ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$  соответственно.

3. Хранение культуры клеток КМС при  $-70^\circ\text{C}$  ограничивалось 4 мес., процент живых клеток после размораживания составлял от 57 до 7%, при этом титр вируса АЧС определяли на уровне  $(3,2-3,86)\pm 0,25 \text{ Ig ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре. — М., 2009. — 120 с.
2. Макаров В.В., Сухарев О.И., Литвинов О.Б. Система «клещи рода *Ornithodoros* — вирус африканской чумы свиней»: биоэкология, вирусология, эпизоотология // Ветеринарная патология. — 2011. — № 3. — С. 18–19.
3. Манин Б.Л. Криоконсервирование и культивирование клеточных линий — две фазы существования биологических объектов // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2008. — Т. 6. — С. 390–405.
4. Методические рекомендации по получению культуры клеток костного мозга свиней для изучения культуральных свойств изолятов вируса африканской чумы свиней / А.А. Варенцова, И.Ю. Жуков, В.Л. Гаврилова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 14 с.
5. Низкотемпературное консервирование костного мозга / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, А.А. Цуцаева [и др.]. — Киев: Наук. Думка, 1976. — 288 с.
6. Оптимизация условий получения культуры клеток костного мозга свиней / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.А. Варенцова [и др.] // IV Международная на-

учно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и наука XXI» 16–20.09.14 г.: сб. научных трудов. Т. 1. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — С. 46–52.

7. Оптимизация условий хранения альвеолярных макрофагов и клеток костного мозга свиней при низких температурах / О.С. Пузанкова, И.Ю. Жуков, А.А. Варенцова [и др.] // IV Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и наука XXI» 16–20.09.14: сб. научных трудов. Т. 1. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — С. 103–111.

8. Способы культивирования вирусов. Культура клеток. — URL: medicalplanet.su/1372/html (дата обращения: 20.11.15).

9. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. — М.: Медицина, 1978. — 200 с.

10. Шишков В.П. Ветеринарный энциклопедический словарь. — М.: Советская энциклопедия, 1981. — С. 247–248.

11. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Interaction entry of African swine fever virus with macrophages // Virus Res. — 1990. — Vol. 17, № 2. — P. 93–104.

12. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. — 1989. — Vol. 168, № 2. — P. 393–398.

13. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. — 1989. — Vol. 171, № 1. — P. 68–75.

14. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into Vero cells does not require virus replication / A.L. Carrascosa, M.J. Bustos, M.L. Nogal [et al.] // Virology. — 2002. — Vol. 294, № 2. — P. 372–382.

15. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages / S. Basta, H. Gerber, A. Schaub [et al.] // Veterinary Microbiology. — 2010. Vol. 140, №1–2. — P. 9–17.

# STUDY OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS REPRODUCTION IN PORCINE PRIMARY BONE MARROW CELL CULTURE BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

I.Yu. Zhukov<sup>1</sup>, I.V. Shevchenko<sup>2</sup>, N.N. Vlasova<sup>3</sup>, A.A. Varentsova<sup>4</sup>, B.L. Manin<sup>5</sup>, O.S. Puzankova<sup>6</sup>, V.L. Gavrilova<sup>7</sup>, A.S. Igolkin<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Leading Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zhukov@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shevchenko@arriah.ru

<sup>3</sup> Chief Researcher, Doctor of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: vlasova\_nn@arriah.ru

<sup>4</sup> Junior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: varentsova@arriah.ru

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: puzankova@arriah.ru

<sup>7</sup> Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gavrilova\_vl@arriah.ru

<sup>8</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: igolkin\_as@arriah.ru

## SUMMARY

This paper presents data on the preparation of cells from porcine bone marrow, spleen, lymph nodes, kidneys and testicles used for African swine fever virus reproduction. Viability of cells after cryopreservation was studied only in porcine bone marrow cell culture. The cell culture was frozen and stored at -70, -150 and -196°C. 10% dimethyl sulfide supplemented with 10% of fetal bovine serum was used as a cryoprotectant. When the cells were thawed and the cryoprotectant was removed 10 IU/ml of heparin sodium was added to prevent cell aggregation. ASFV culturing in porcine bone marrow cell culture stored at -150 and -196°C during 5-6 months demonstrated the highest haemadsorption titers:  $5.76 \pm 0.25 \lg \text{HA}_{50}/0,15 \text{ cm}^3$  and  $(4,66-4,87) \pm 0,25 \lg \text{HA}_{50}/0,15 \text{ cm}^3$ , respectively. Porcine bone marrow cells remained viable only for four months of storage at -70°C and were able to maintain the virus reproduction at the level of  $(3,2-3,86) \pm 0,25 \lg \text{HA}_{50}/0,15 \text{ cm}^3$  when thawed.

**Key words:** African swine fever virus, porcine bone marrow cell culture, virus hemadsorption titer.

## INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a mostly lethal contagious viral disease in pigs characterized by acute toxicosis and bleeding diathesis [6]. The disease has been previously reported in Africa, Spain, Portugal, France, Brazil and Cuba. Some characteristics suggest that this epizootic disease turns into a panzootic [1, 2].

ASF introduction and spread causes huge economic losses in the pig production industry [8]. Reliable and timely diagnosis is a key factor for measures taken to contain the infection. [10].

Cells, obtained *in vitro* from ASF-susceptible animals (*Sus scrofa*). They include cells derived from organs (porcine kidneys, testicles) and hematopoietic system (bone marrow, lymph node and spleen cells) [6, 8]. All mentioned primary cell cultures are susceptible to ASF virus in different ways, that's why not all cells are involved into virus reproduction. But methodically correct preparation of such cells turns them into an indispensable part of the research. Beside primary cell cultures, continuous cell cultures from different animals, including simians (Vero-V, CV-1) can be used for ASF diagnosis and virus isolation. But homologous objects and the most susceptible cells are the first choice [11-15].

The obtaining of fresh bone marrow cells and other primary objects is a labour-intensive process; that's why it was attempted to study the conditions of cell suspension storage at low and ultra-low temperatures and their effect on ASF virus reproduction when thawed.

In medical science and practice cryopreservation of bone marrow cells is widely used for transplantation practices [5]. Basic methodical approaches to this problem have been elaborated thanks to some fundamental studies. A wide range of cryoprotectants, used for cell cryopreservation, has been determined, like PEO-400, ethylene glycol, DMSO and etc. [3]. It is known that the freezing speed of bone marrow cells after crystallization must be very high in order to prevent intracellular crystallization, and that was taken into account in this study.

## MATERIALS AND METHODS

Piglets, 2-4 month-old, 15 to 30 kg bw, originating from the Vladimir Oblast farms free from infectious diseases were used in the study.

After the piglets were decapitated, their tubular bones were isolated for bone marrow cell culture (BMCC) preparation [4, 7, 9] and spleens, testicles, lymph nodes and kidneys were aseptically removed [1]. Tissues were thoroughly ground and saline solution supplemented with antibiotics like benzylpenicillin, potassium/sodium salts, streptomycin, cefotaxime, gentamicin, metronidazole was added. 0,25% trypsin solution for porcine kidneys (PK) was used for trypsinization. For better washing cell suspension was placed into a thermoshaker for 30 minutes at  $t=37^\circ\text{C}$ . Supernatant was poured into a sterile container containing fetal bovine serum (FBS, 10% of the composition). Fresh 0,25% trypsin solution for PK was added to the sediment and was placed again into a thermoshaker for 30 minutes at  $t=37^\circ\text{C}$ . The supernatants were mixed in one container, gauze-filtered and centrifuged at 1000 rpm for 20 minutes. The sediment was resuspended in the medium supplemented with 10 IU/ml of heparin sodium; the latter facilitated the desintegration of conglomerates into separate cells. Then, in order to remove heparin sodium, the sediment was centrifuged again at 1000 rpm for 20 minutes. The sediment was resuspended in the medium, filtered using 70  $\mu\text{m}$  mesh size SDL «Cell Strainer» and then diluted up to the appropriate concentration. Nutrient media, like Eagle's medium, semisynthetic medium, DMEM/F-12, containing 20% of FBS, were used for cell culture seeding. Cells were counted using both standard applied methods (counting in Goryaev's chamber) and in Countess™ automated cell counter (Invitrogen™, Korea). Primary cell cultures were seeded in plastic 96-well plates and 25  $\text{cm}^2$ -plastic flasks. Cell cultures were cultured in  $\text{CO}_2$  incubator with 5%  $\text{CO}_2$ .

Porcine bone marrow was trypsinized in a similar way, but 0,25% trypsin solution was replaced by the mixture of trypsin solution (0,25%) and versene solution (0,02%) in 1:5 ratio in the amount of 50 ml for 450 ml of Eagle's medium.

Working suspension of porcine red blood cells was prepared for ASF virus hemadsorption assay. For this purpose 200 ml of piglet blood was collected to a sterile

**Table 1**  
Selection of cell concentration for preparation of confluent monolayer in 25  $\text{cm}^2$  flasks and 96-well plates

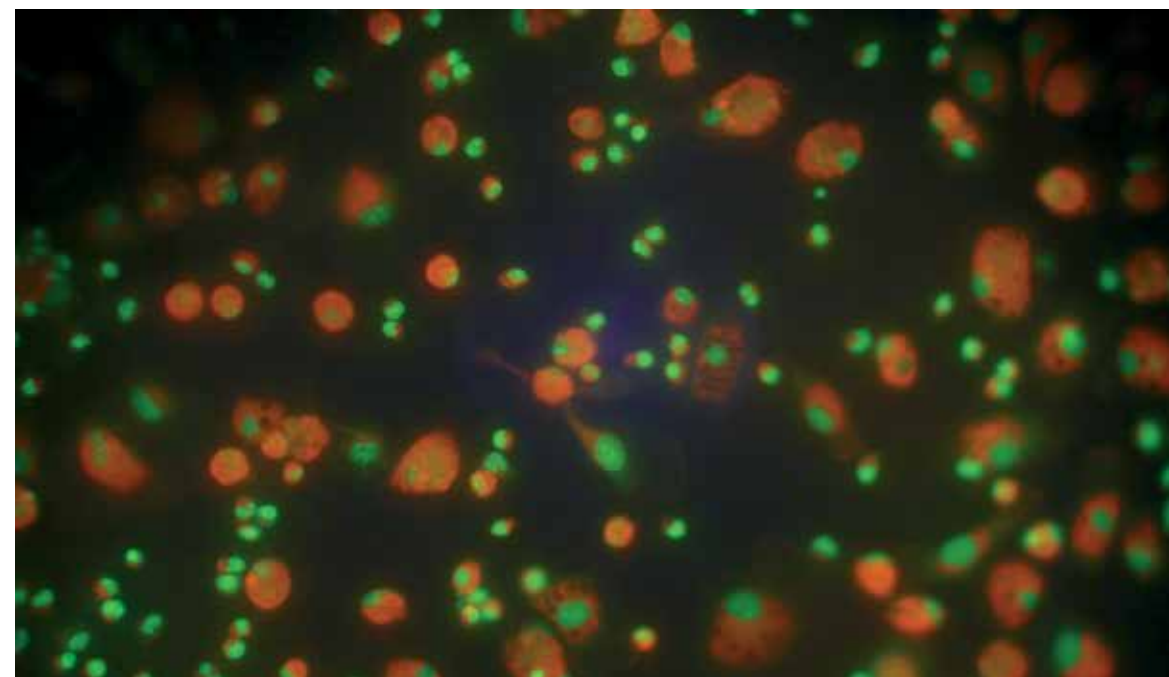
Cell culture	Cell concentration in 1 ml	Amount of cell suspension, seeded in	
		flasks ( $S=25 \text{ cm}^2$ )	96-well plates
BM	6-8 mln	10 ml	100 $\mu\text{l}$
PK	500 ths		
LN	6-8 mln		
PS	6 mln		
PT	500 ths-2 mln		

bottle containing glass beads and shaken for 30 minutes till the fibrin clots were formed. Then blood was filtered in a funnel using 4-layer sterile gauze. Filtered blood was then centrifuged at 1000 rpm for 10-15 minutes for serum detachment; then serum was collected to a separate container. Sedimented RBCs were washed three times with saline solution (50 ml each time) and then centrifuged again at 1000 rpm for 10-15 minutes. Sedimented RBCs were diluted with saline solution in 1:10 ratio and thus the master suspension was prepared. 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  of gentamicin was added to the prepared suspension and was stored for a month at  $t=4^\circ\text{C}$ . The master suspension was used for the preparation of RBC working solution in a following way: 9 ml of saline solution were added to 1 ml of suspension.

In this study porcine BMCC was infected with ASFV Odintsovo 02/14 isolate at the dose of 0,1-0,01  $\text{HA}_{50}/\text{cell}$ .

10% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a cryoprotectant [3], 10% FBS was added. Porcine BMCC in  $5,0 \times 10^6 \text{ cell}/\text{cm}^3$  concentration was filled into 5,0 ml plastic tubes and stored at -70, -150 and -196°C in liquid nitrogen in Dewar flasks for 6 months. After 1, 2, 3, 4, 5, 6 months of storage porcine BMCCs were thawed at room temperature and diluted in Eagle's medium. Then the suspension was

**Fig. 1.** Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), 24 hours post seeding





**Table 2**  
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -70°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU <sub>50</sub> /0,15 cm <sup>3</sup>
1	4,5×10 <sup>6</sup>	57	(3,2–3,86)±0,25
2	4,3×10 <sup>6</sup>	30	
3	4,3×10 <sup>6</sup>	28	
4	3,2×10 <sup>6</sup>	7	
5	2,8×10 <sup>6</sup>	0	
6	2,0×10 <sup>6</sup>	0	

**Table 3**  
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -150°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU <sub>50</sub> /0,15 cm <sup>3</sup>
1	4,4×10 <sup>6</sup>	95	5,76±0,25
2	4,2×10 <sup>6</sup>	94	
3	3,2×10 <sup>6</sup>	91	
4	4,1×10 <sup>6</sup>	54	
5	4,4×10 <sup>6</sup>	39	
6	3,0×10 <sup>6</sup>	37	

**Table 4**  
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -196°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU <sub>50</sub> /0,15 cm <sup>3</sup>
1	1,7×10 <sup>6</sup>	89	(4,66–4,87)±0,25
2	1,7×10 <sup>6</sup>	85	
3	1,6×10 <sup>6</sup>	82	
4	1,3×10 <sup>6</sup>	80	
5	1,4×10 <sup>6</sup>	80	
6	1,4×10 <sup>6</sup>	72	

centrifuged at 1000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed, the sediment was dissolved in Eagle's medium and total amount of cells was counted as well as the percentage of viable cells among them. The sediment then was seeded in 96-well plates, 100 µl/well. In 48 hours, without any medium change, the porcine BMCC was infected with ASF virus. ASF virus hemadsorption activity in porcine BMCC was tested in 5–7 days.

## RESULTS AND DISCUSSION

Cells derived from different organs (bone marrow, spleen, testicles, kidneys, lymph nodes), are different in size and demonstrate different polymorphism; that's why the optimal cell concentration was selected to obtain a confluent layer appropriate for virological study.

For the preparation of porcine BM cell culture 10 IU/ml of heparin sodium was shaken at t=37°C for 30 minutes in order to prevent hematopoietic stem cell aggregation during freezing. Other cell cultures, porcine spleen (PS), lymph nodes (LN), porcine testicles (PT) and porcine kidneys (PK) were similarly treated with heparin sodium.

Cell cultures were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks and 96-well plates. Cell seed concentration and amounts are shown in Table 1.

Based on the data obtained during the experiments (Table 1) the highest cell concentration is needed for porcine BM, LN and PS cell seeding. In order to prepare a confluent monolayer, the amount of PK cells needed is 4 times less, and PT cell amount may vary from 500 thousand to 2 million. During the experiments cell monolayer was formed in 24–72 hours when such concentrations were used. The inoculation volume of cell suspension did not correlate with the type of cell suspension and was equal to 10 ml per S=25 cm<sup>2</sup> flask and 100 µl per one well of 96-well plate. Nutrient media in flasks and well seeded with porcine BM cells were changed every 48 hours and Eagle's media in flasks filled with PK, LN, PS and PT cells were changed every 48–72 hours. Eagle's medium also contained 20% of FBS.

BMCC monolayer was infected with ASFV Odintsovo 02/14 isolate at the dose of 0,1–0,01 HAdU<sub>50</sub>/cell. ASF virus obtained in 5–7 days post infection was titrated in 96-well plates [4]. ASF virus titers were 6,5 to 7,0±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

Then sensitivity of BM cells to ASF virus stored for 1, 2, 3, 4, 5, 6 months at -70, -150 and -196°C was studied. The preservative agent was removed from cell suspension by centrifuging at 1000 rpm for 15 minutes. The obtained sediment was dissolved in the medium and seeded into 96-well plates, 100 µl/well, and the number and percentage of survived cells were calculated. In 48 hours porcine BMCC was infected with ASF virus. ASF virus hemadsorption activity was tested in 5–7 days. The results of ASF virus reproduction in porcine BMCC at three different storage temperatures are shown in Tables 2–4.

The results of the experiments (Table 2) showed that the number of viable porcine BM cells stored for 5–6 months at 70°C after thawing is 0. The percentage of viable cells stored for 1–4 months was within 57–7%. ASF virus hemadsorption titre in porcine BBMC was within 3,2±0,25–3,86±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

As it is seen from the results in Table 3, the percentage of viable porcine BM cells declined from 95 to 37% with the increase in storage time; ASF virus hemadsorption titre was 5,76±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

Based on the data obtained (Table 4) it was determined that the number of viable cells stored at -196°C did not significantly varied during 6 months and was within 72–89%. Number of cells after thawing was from 4,66±0,25 to 4,87±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

The conducted study demonstrated that cell concentration during primary freezing of cell suspension was 5,0×10<sup>6</sup> cell/cm<sup>3</sup>, and just in a month the number of cells was 3 times smaller and this level was maintained during the whole period of the study.

This means, that when porcine MB cells are put into storage at -196°C, it is necessary to take the maximum possible cell concentration.

Table 2–4 show that independent from the storage temperature, porcine BM cells formed a monolayer in plate wells sufficient for ASF virus titration. ASF virus hemadsorption titre in porcine BMCC tested in cells stored at -150°C was 5,76±0,25 HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>. Cell viability percentage at -196°C was as high as during the storage at -150°C, but the virus titre decreased to (4,66–4,87)±0,25 HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

In the course of further tests aimed at the study of porcine BM cell morphology using fluorescence micros-

copy (eye-piece lens ×10; objective lens ×60) cell polymorphism was detected.

Fig. 1 shows that the specimen contained two types of cells: bone marrow cells looking like small cells with green nuclei and large adherent stromal cells.

After storing porcine BMCC at -196°C (Fig. 2) during three months the number of stromal cells became smaller and a big amount of small porcine BM hematopoietic stem cells with green nuclei were found to be in extracellular matrix fibers.

After 6 months of porcine BM cell suspension storage in liquid nitrogen at -196°C cell viability was pretty high, i.e. 72% of viable cells (Fig. 3).

This means the adhesivity of stromal cells after long-term storage (observation period is 6 months) decreases less than the adhesivity of porcine BM hematopoietic stem cells.

## CONCLUSIONS

1. The studies proved that when preparing porcine BM, PS and LN cells the addition of 10 IU/ml of heparin sodium prevents their aggregation. After shaking using thermoshaker for 30 minutes at t=37°C not more than 1–2 conglomerates were seen in the microscope field of view. (1×10 magnification).

2. Porcine BMCC was better preserved at -150°C and -196°C for 5–6 months; ASF virus hemadsorption titres were 5,76±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup> and (4,66–4,87)±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>, respectively.

3. The storage of porcine BMCC at -70°C was limited to 4 months; the percentage of viable cells after thawing was within 57–7%; herewith ASF virus titre was (3,2–3,86)±0,25 lg HAdU<sub>50</sub>/0,15 cm<sup>3</sup>.

## REFERENCES

1. Dyakonov L.P. Animal cell in culture. – M., 2009. – 120 p.
2. Makarov V.V., Sukharev O.I., Litvinov O.B. *Ornithodoros* ticks – African swine fever virus system: Bioecology, virology, epidemiology // Veterinarnaya Patologiya. – 2011. – № 3. – P. 18–19.
3. Manin B.L. Cryopreservation and culturing of cell lines: two phases of biological object existence // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. – Vladimir, 2008. – Vol. 6. – P. 390–405.
4. Methodical recommendations for preparation of porcine bone marrow cell culture for study of ASFV isolate cultural properties / A.A. Varentsova, I.Yu. Zhukov, V.L. Gavrilova [et al.]; FGBI «ARRIAH». – Vladimir, 2014. – 14 p.
5. Low-temperature preservation of bone marrow / N.S. Pushkar, A.M. Belous, A.A. Tsutsayeva [et al.]. – Kiev: Naukova Dumka, 1976 – 288 p.
6. Optimization of bone marrow cell culture preparation conditions / I.Yu. Zhukov, I.V. Shevchenko, A.A. Varentsova [et al.] // The IV International scientific workshop for young scientists «Youth and Science XXI» 16–20.09.14.: Proceedings. Vol. 1. – Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2014. – P. 46–52.
7. Optimization of storage conditions for porcine alveolar macrophages and bone marrow cells at low temperatures / O.S. Puzankova, I.Yu. Zhukov, A.A. Varentsova [et al.] // The IV International scientific workshop for young scientists «Youth and Science XXI» 16–20.09.14.: Proceed-

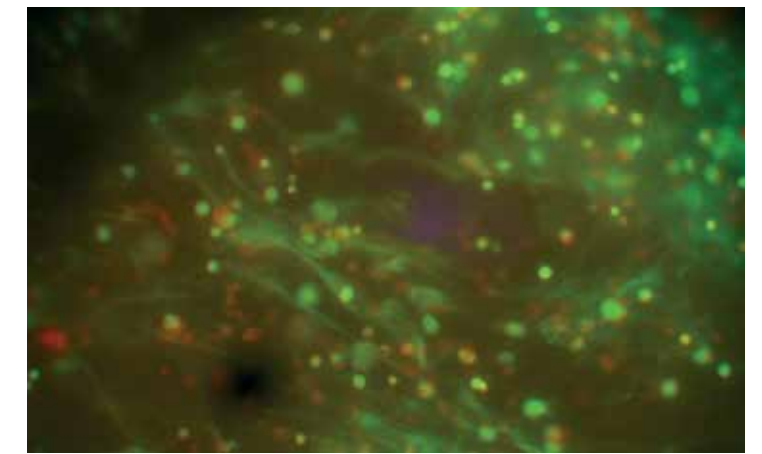


Fig. 2. Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), post 3 months of storage at -196°C in liquid nitrogen

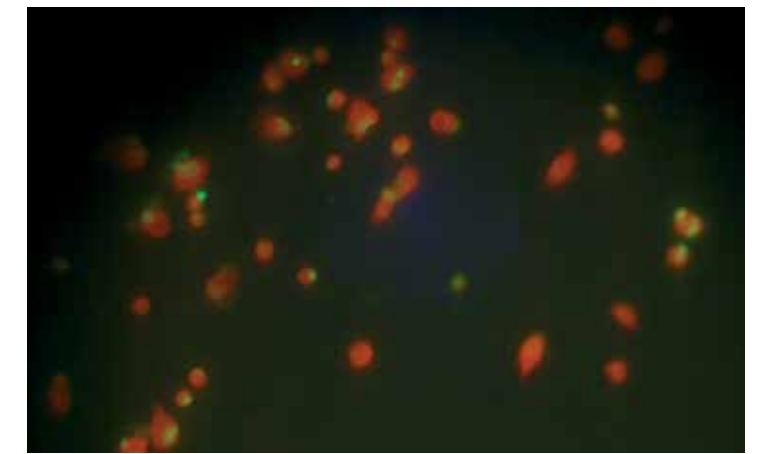


Fig. 3. Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), post 6 months of storage at -196°C in liquid nitrogen

ings. Vol. 1. – Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2014. – P. 103–111.

8. Virus culture methods. Cell culture. – URL: medical-planet.su/1372/html (reference date: 20.11.15).

9. Uchitel I.Ya. Role of macrophages in immunity. – M.: Meditsina, 1978. – 200 p.

10. Shishkov V.P. Veterinary medicine encyclopedia. – M.: Sovetskaya Entsiklopedia, 1981. – P. 247–248.

11. Alcami A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Interaction entry of African swine fever virus with macrophages // Virus Res. – 1990. – Vol. 17, № 2. – P. 93–104.

12. Alcami A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. – 1989. – Vol. 168, № 2. – P. 393–398.

13. Alcami A., Carrascosa A.L., Vinuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. – 1989. – Vol. 171, № 1. – P. 68–75.

14. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into Vero cells does not require virus replication / A.L. Carrascosa, M.J. Bustos, M.L. Nogal [et al.] // Virology. – 2002. – Vol. 294, № 2. – P. 372–382.

15. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages / S. Basta, H. Gerber, A. Schaub [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2010. Vol. 140, №1–2. – P. 9–17.



# СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Д.А. Бирюченков<sup>1</sup>, Е.П. Баборенко<sup>2</sup>, Е.А. Авситидийский<sup>3</sup>, Д.Л. Долгов<sup>4</sup>, Ж.Ю. Мурадян<sup>5</sup>, А.И. Албулов<sup>6</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: biruchenkov@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: baborenko@arriah.ru

<sup>3</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: avsitidiysky@arriah.ru

<sup>4</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: dolgov@arriah.ru

<sup>5</sup> аспирант, ФГНБУ «ВНИТИБП», г. Щелково

<sup>6</sup> заведующий отделом, доктор биологических наук, профессор, ФГНБУ «ВНИТИБП», г. Щелково

## РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения антигенной активности и местной тканевой реакции у свиней, иммунизированных экспериментальной вакциной против репродуктивно-респираторного синдрома свиней, изготовленной на основе коммерческих адъювантов фирмы SEPPIC (Франция) с включением в состав водорастворимых производных хитозана.

Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней, вакцина, адъювант, хитозан.

## ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) наносит значительный экономический ущерб свиноводству многих стран мира. Появление PPCC в конце 80-х гг. прошлого века связывают со вспышками в Канаде и США «загадочной болезни свиней», которую впоследствии именовали «синим ухом». В дальнейшем подобная инфекция была зафиксирована и во многих странах мира [7, 9]. В России первые клинически зарегистрированные случаи обнаружения PPCC отмечались в 90-х гг. прошлого века. Впервые PPCC был диагностирован в 1993 г. в ряде свиноводческих хозяйств Курской области [6].

Возбудителем PPCC является вирус, который был впервые выделен и классифицирован как артеривирус только в 1991 г. Инфекционный агент, лишь однократно попав в свиноводческое хозяйство, сохраняется и остается активным в течение неопределенно долгого времени.

У вируса PPCC имеется высокоспецифическое сродство к макрофагам; вирус способен размножаться в них, что ведет к утрате основной части механизма защиты организма восприимчивого животного и позволяет другим инфекциям наслаиваться и вызывать тяжелые осложнения. Ярким примером такого явления может служить заметное усиление тяжести течения эн-

зоотической пневмонии, гемофилезного полисерозита, цирковирусной инфекции 2 типа и гриппа свиней после заражения животных вирусом PPCC [8].

Известно, что в мире наиболее широко распространен вирус PPCC двух генотипов: европейский и американский, последний широко распространен в Америке и Юго-Восточной Азии. В свинохозяйствах России до 2007 г. в основном циркулировали изоляты вируса PPCC, принадлежащие европейской генетической группе [3].

Совершенствование средств специфической профилактики PPCC является одной из актуальных задач современного свиноводства. В настоящий момент существует широкий ассортимент препаратов против PPCC зарубежного производства, однако их высокая стоимость в значительной степени ограничивает возможности российских производителей свинины, на своем опыте столкнувшихся с проблемой PPCC.

Одним из аспектов совершенствования вакцины является поиск и внедрение современных иммуномодуляторов и сорбентов, обладающих максимально выраженным биологическим сродством [5, 7, 10].

Природный хитозан обладает такими свойствами, как высокая сорбционная емкость, нетоксичность, бактериостатическая активность [2]. Также он является хорошим флокулянт, загустителем, а его низкомолекулярные фракции, получаемые из высокомолекулярного природного сырья путем химического или ферментативного гидролиза, обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами благодаря способности в максимально короткие сроки активизировать выработку белков иммунного ответа, поэтому попытка совершенствования инактивированной вакцины против PPCC с использованием хитозана является актуальной задачей [1].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 1–1,5-месячных подсвинков живой массой 15–20 кг, полученных из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям. Подо-

пытных поросят выдерживали в карантине в течение 7 дней с ежедневным клиническим осмотром и измерением температуры тела.

В качестве адъювантов использовали продукцию фирмы SEPPIC™ (Франция), давно зарекомендовавшую себя на российском рынке с положительной стороны. В частности, в свиноводстве рекомендованы к использованию Montanide ISA 70 VG™ и Montanide ISA 206 VG™.

Адъювант Montanide ISA 206 VG стерилизовали «холодным» способом с применением стерилизующего фильтра Sartobran (производитель Sartorius) с диаметром пор не более 0,22 мкр.

Адъювант Montanide ISA 70 VG серии U40218 36018A стерилизовали в автоклаве в строгом соответствии с рекомендациями производителя (при температуре 121°C и давлением 1,0 атм в течение 40 мин).

В работе использовали европейский штамм вируса PPCC «КПР-96», депонированный в ФГБУ «ВГНКИ» в 2004 г. и выращенный в монослое перевиваемой культуры клеток почки макаки резус (Marc-145).

Стерильную форму препарата сукцината хитозана (далее хитозана) (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково) добавляли в водный раствор инактивированного антигена до конечной концентрации 0,25%.

Изготовление образцов с добавлением хитозана или без него проводили строго в соответствии с рекомендациями производителя адъюванта: № 1 — на основе Montanide ISA 206 VG; № 2 — на основе Montanide ISA 206 VG + хитозан; № 3 — на основе Montanide ISA 70 VG + хитозан; № 4 — на основе Montanide ISA 70 VG.

Все полученные опытные образцы вакцин вводили внутримышечно в дозе 2 см<sup>3</sup>/гол. В течение 10 последующих дней проводили пальпацию кожи в области введения вакцины на предмет гиперемии, гипертермии и припухлости, а также проводили ректальное измерение температуры тела.

Ревакцинацию проводили через 21 день после вакцинации. Повторную клиническую диагностику местной реакции с посуточной термометрией проводили вышеописанным способом.

От животных отбирали пробы крови и исследовали полученные сыворотки крови на наличие антител к вирусу PPCC с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН) до вакцинации, перед ревакцинацией (21 сутки), 14, 21 и 42 суток после нее. Сыворотки крови получали посредством центрифугирования проб крови (1500 г, 4°C) в течение 30 мин и хранили при температуре –20°C до проведения анализа.

Сыворотки крови свиней исследовали на наличие антител против вируса PPCC с использованием коммерческого набора Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus Antibody Test Kit™ (IDEXX™, Europe) согласно прилагаемой инструкции по применению и в РН по стандартной методике [4].

Убой подопытных животных проводили через 63 дня после вакцинации с последующим проведением патологоанатомического вскрытия и тщательного изучения места введения опытных препаратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опыте было 5 групп по 4 подсвинка в каждой, одну из которых, выбранную случайным образом, использовали как контроль. Все вышеперечисленные группы содержались изолированно друг от друга.



Рис. 1. Изменения в месте введения образца № 1 у поросенка

У отдельных животных через 24 ч после вакцинации наблюдали гипертермию. Так, у 2 из 4 поросят, привитых препаратом № 2, отмечено повышение температуры тела до (40,8±0,2)°C. Гипертермию в пределах (40,4±0,1)°C в указанные сроки зафиксировали также у 3 поросят, которым вводили опытный образец № 3. Угнетения, снижения аппетита и каких-либо иных отклонений от нормы при этом у животных не наблюдали.

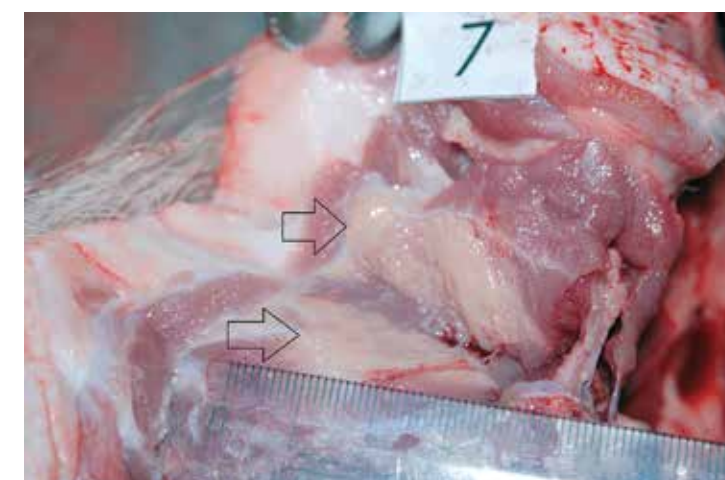
Повышение температуры тела свыше 40°C через 24 ч после повторного введения вакцины было зафиксировано у 2 поросят из группы, в которой животным вводили препарат № 2, у 1 поросенка из группы, в которой вводили препарат № 3, без каких-либо клинических признаков недомогания (в т.ч. угнетения, ухудшения аппетита и т.п.). В дальнейшем испытываемые животные оставались здоровыми в течение всего срока наблюдения.

По окончании опыта все животные были подвергнуты диагностическому убою гуманным методом с проведением патологоанатомического вскрытия.

У поросят, которым вводили образец вакцины № 1, в месте инъекции наблюдали значительное разрастание рыхлой соединительной ткани, пронизанной мелкими каплями испытываемого препарата («икринками»), площадью 2,0×3,5 см (рис. 1).

У поросят, которым вводили образец вакцины № 2, в месте инъекции наблюдали обширные изменения соединительной ткани, пронизанной мелкими пузырька-

Рис. 2. Изменения в месте введения образца № 2 у поросенка





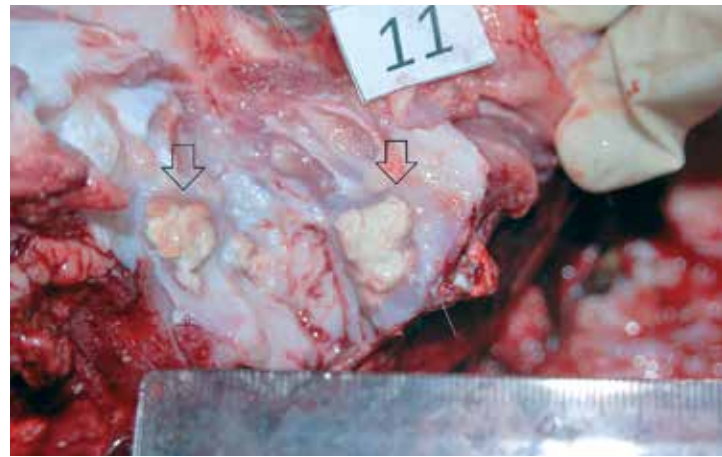


Рис. 3. Изменения в месте введения образца № 3 подопытному животному №11

ми вакцины. Общая площадь измененной ткани значительно превышала 3 см<sup>2</sup> (рис. 2).

У свиней, которым вводили образец вакцины № 3, в месте инъекции отмечали незначительные изменения соединительной ткани с образованием выраженного «депо» вакцины в месте введения препарата, а общая площадь измененной ткани не превышала 1 см<sup>2</sup> (рис. 3).

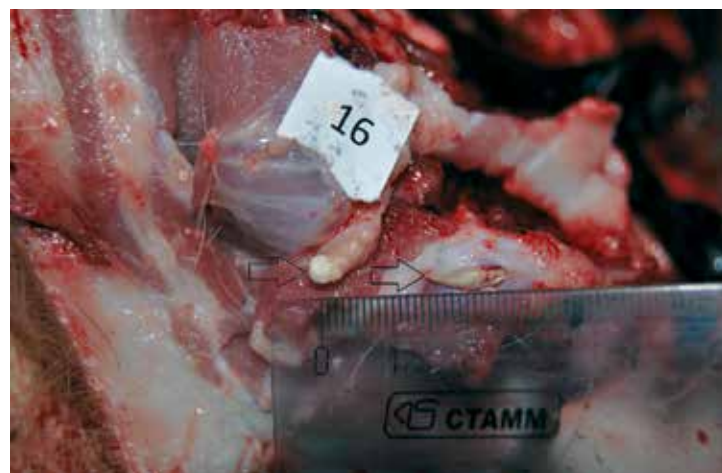
У поросят, которым вводили опытный образец вакцины № 4, в месте инъекции наблюдали незначительные изменения соединительной ткани с образованием выраженного «депо» вакцины в месте введения препарата, а общая площадь измененной ткани составляла от 0,9 до 1,5 см<sup>2</sup> (рис. 4).

От животных до иммунизации, перед ревакцинацией (21 сутки), через 14 дней после ревакцинации, затем на 21 сутки и по окончании опыта отбирали пробы крови, затем исследовали сыворотки крови на наличие антител к вирусу РРСС в ИФА и РН. Результаты исследования представлены в таблице.

Из представленных в таблице данных видно, что до вакцинации антитела к РРСС в сыворотках крови свиней не обнаруживались.

Через 21 день после вакцинации в сыворотках крови опытных животных, вакцинированных образцами № 1 и № 2, в ИФА специфические антитела к вирусу РРСС не выявили, средние значения оптической плотности (s/p) достигали значений 0,04 и 0,06 соответственно. В то время как в группах животных, вакцинированных

Рис. 4. Изменения в месте введения опытного образца № 4 у свиньи



образцами № 3 и № 4, выявили специфические антитела к вирусу РРСС; средние значения s/p составляли 0,83 и 0,65 соответственно.

Через 14, 21 и 42 дня после ревакцинации в сыворотках крови опытных животных, вакцинированных образцами № 1 и № 2, уровень антигенной активности к вирусу РРСС в ИФА практически не изменялся. Положительная динамика накопления специфических антител наблюдалась в группах, вакцинированных образцами № 3 и № 4: средние значения s/p составили от 1,6 до 2,6 и от 1,04 до 2,25 соответственно.

Таким образом, у привитых вакцинами № 1 и № 2 свиней отсутствие специфических антител может свидетельствовать о низком уровне адъювантных свойств Montanide ISA 206 VG, который в достаточной степени не смогло нивелировать даже добавление хитозана.

В то же время уровень специфических антител к вирусу РРСС у животных, иммунизированных образцами вакцин на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG как с хитозаном, так и без его добавления на всех сроках отбора подтверждает высокую антигенную активность препаратов и устойчивую положительную динамику антителообразования у привитых поросят.

### ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенных исследований показали, что после введения опытных образцов вакцины у всех поросят наблюдали кратковременное повышение температуры тела в пределах физиологической нормы, что в целом не оказывало видимых негативных последствий для состояния здоровья подопытных животных.

2. У свиней, привитых препаратами на основе адъюванта Montanide ISA 206 VG как в чистом виде, так и в ассоциации с хитозаном, при патологоанатомическом исследовании регистрировали значительное разрастание рыхлой соединительной ткани в месте введения вакцины. При этом у данной группы животных не наблюдалось образования специфических антител в достаточном для защиты организма количестве. В то же время у животных, которым вводили вакцину на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG как с хитозаном, так и без него, уже через 1,5 месяца после ревакцинации в крови наблюдалось значительное повышение уровня вируснейтрализующих антител, сопровождаемое образованием в месте введения компактного по своим размерам «депо» вакцины, способствующего развитию стойкого и продолжительного иммунитета.

3. Темпы нарастания титров специфических антител при изначально равных в отношении использования адъюванта условиях в группе № 3 значительно превышают таковые в группе № 4, что может свидетельствовать о положительной роли водорастворимого хитозана в совершенствовании инактивированных вакцин против РРСС.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние хитозана на иммунную и эндокринную системы поросят / А.А. Буянов, В.Н. Виденин, А.Н. Гречухин, В.Д. Нифантов // Ветеринария. — 2004. — № 2. — С. 47–51.

2. Воробьева А.А., Медуницын Н.В. Новые принципы и методы создания иммунобиологических препаратов // Медицина. — 1999. — № 10. — С. 16–17.

3. Генетическое обилие вируса РРСС / А.В. Щербаков, В.Ф. Ковалишин, В.А. Пыльнов [и др.] // Актуал. проблемы инфекц. патологии животных: матери-

### Таблица

Изучение антигенной активности опытных образцов вакцин против РРСС инактивированных эмульгированных с использованием адъювантов SEPPIC и хитозана

№ опытного образца вакцины	№ жив-го	Антигенная активность в ИФА — s/p значения*; в реакции нейтрализации — log <sub>2</sub>									
		до вакцинации		21 сутки после вакцинации**		14 суток после ревакцинации		21 сутки после ревакцинации		42 суток после ревакцинации	
		ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН
№1 (ISA 206)	1	0,01	<2,0	0,08	<2,0	0,09	<2,0	0,09	2,0	0,09	2,0
	2	0,02	-***	0,02	-	0,03	3,25	0,04	3,25	0,09	3,0
	3	0,02	-	0,02	-	0,03	<2,0	0,03	3,0	0,03	3,0
	4	0,02	-	0,03	-	0,03	3,0	0,03	3,0	0,04	2,75
		<b>0,02±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,04±0,002</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,045±0,001</b>	<b>2,5±0,002</b>	<b>0,05±0,001</b>	<b>2,8±0,002</b>	<b>0,06±0,001</b>	<b>2,7±0,004</b>
№2 (ISA 206+ хитозан)	5	0,01	<2,0	0,04	-	0,06	3,25	0,08	3,25	0,2	3,25
	6	0,02	-	0,06	-	0,06	3,0	0,09	3,0	0,15	3,25
	7	0,02	-	0,05	-	0,08	<2,0	0,13	3,75	0,16	3,0
	8	0,05	-	0,1	<2,0	0,2	<2,0	0,4	3,0	0,5	3,0
		<b>0,02±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,06±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,1±0,003</b>	<b>2,5±0,002</b>	<b>0,2±0,001</b>	<b>3,25±0,002</b>	<b>0,3±0,001</b>	<b>3,1±0,002</b>
№3 (ISA 70+ хитозан)	9	0,03	-	0,8	5,25	0,7	7,5	1,8	7,75	2,71	8,5
	10	0,02	-	1,5	7,0	1,5	8,0	2,4	8,5	2,64	8,5
	11	0,01	-	0,3	7,0	2,2	8,5	1,9	9,0	2,0	8,75
	12	0,02	-	0,74	7,0	2,0	7,75	2,4	8,5	3,0	8,75
		<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,83±0,003</b>	<b>6,56±0,002</b>	<b>1,6±0,001</b>	<b>8,0±0,004</b>	<b>2,1±0,002</b>	<b>8,4±0,005</b>	<b>2,6±0,001</b>	<b>8,6±0,002</b>
№4 (ISA 70)	13	0,02	-	0,7	4,75	0,97	5,7	1,2	5,75	2,4	6,0
	14	0,02	-	0,4	5,0	1,1	6,0	1,9	6,0	2,1	6,25
	15	0,01	-	0,6	5,75	0,8	6,25	2,0	6,5	2,3	6,5
	16	0,06	-	0,9	5,5	1,3	6,0	1,4	6,0	2,2	7,25
		<b>0,03±0,001</b>	-	<b>0,65±0,003</b>	<b>5,25±0,004</b>	<b>1,04±0,001</b>	<b>6,0±0,005</b>	<b>1,6±0,002</b>	<b>6,1±0,006</b>	<b>2,25±0,003</b>	<b>6,5±0,004</b>
Контроль	17	0,03	-	0,01	<2,0	0,01	-	0,03	-	0,03	-
	18	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-
	19	0,01	-	0,04	-	0,01	-	0,02	-	0,03	-
	20	0,03	-	0,05	-	0,02	-	0,01	-	0,04	-
		<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,03±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,015±0,002</b>	-	<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,03±0,003</b>	-

\* значение s/p < 0,4 — положительное; \*\* ревакцинация; \*\*\* не улавливаемое в реакции значение вируснейтрализующих антител.

алы Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2003. — С. 150–155.

4. Методика постановки реакции нейтрализации для ретроспективной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) / Т.З. Байби-ков, Л.Г. Жучкова, Ш.К. Куляшбекова, В.Л. Гаврилова; ВНИИЗЖ. — Владимир, 1995. — 5 с.

5. Нудьга Л.А. Производные хитина и хитозана и их свойства // Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение. — М., 2002. — С. 141–142.

6. Репродуктивно-респираторный синдром свиней («синее ухо») / В.А. Мищенко, В.М. Авилов, В.М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 1994. — № 9. — С. 22–24.

7. Chitosan — mediated stimulation of macrophage function / G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri [et al.] // Biomaterials. — 1994. — Vol. 15, № 15. — P. 1215–1220.

8. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody / E.M. Bautista, S.M. Goyal, I.J. Yoon [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. — 1993. — Vol. 5, № 2. — P. 163–165.

9. Morin M., Robinson Y. Causes of mystery swine disease // Can. Vet. J. — 1992. — Vol. 33, № 1. — P. 6.

10. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.-W. Cho, Y.-N. Cho, S.-H. Chung [et al.] // Biomaterials. — 1999. — Vol. 20, № 22. — P. 2139–2145.



# IMPROVEMENT OF INACTIVATED VACCINE AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE RESPIRATORY SYNDROME

D.A. Biruchenkov<sup>1</sup>, Ye.P. Baborenko<sup>2</sup>, Ye.A. Avsitiyevskiy<sup>3</sup>, D.L. Dolgov<sup>4</sup>, Zh.Yu. Muradyan<sup>5</sup>, A.I. Albulov<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: baborenko@arriah.ru

<sup>3</sup> Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: avsitiyevskiy@arriah.ru

<sup>4</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: dolgov@arriah.ru

<sup>5</sup> PhD student, Federal State Budgetary Scientific Institution «VNITIBP», Schelkovo

<sup>6</sup> Head of the Department, Doctor of Science (Biology), Professor, Federal State Budgetary Scientific Institution «VNITIBP», Schelkovo

## SUMMARY

The paper presents results of studying antigenicity and local tissue reaction in pigs immunized with the experimental PRRS vaccine produced on the basis of commercial SEPPIC (France) adjuvants with addition of water-soluble chitosan derivatives.

Key words: porcine reproductive respiratory syndrome, vaccine, adjuvant, chitosan.

## INTRODUCTION

Porcine reproductive respiratory syndrome (PRRS) causes great economic losses to pig production in many countries of the world. PRRS occurrence in the end of 80s last century is associated with «mystery swine disease» registered in Canada and USA which was later called «blue ear». Hereafter the disease was registered in many countries of the world [7, 9]. In Russia the disease was firstly registered in the 90s of the last century. For the first time PRRS was diagnosed on Russia in 1993 in several pig farms of Kursk Oblast. [6].

PRRS agent is the virus which was for the first time recovered and classified as Arterivirus only in 1991. The infectious agent once penetrating a pig farm remains present and active indefinitely.

PRRS virus has highly specific affinity for macrophages; the virus multiplies in them thus removing a major part of the bodies defense mechanism and allowing other infections penetrate and cause severe complications. A common example of this is increase of severity of enzootic pneumonia, hemophilic polyserositis, circovirus infection Type 2, and swine influenza when pigs become infected with PRRS virus [8].

It is known that two PRRS genotypes are widely spread in the world: European and American, the latter is widely spread in America and South-East Asia. PRRS virus isolates belonging to the European genetic group circulated in Russian pig farms before 2007 [3].

Improvement of PRRS specific prophylaxis is one of topical tasks of the contemporary pig production. Today there

is a wide range of foreign drugs against PRRS but their high price considerably restricts opportunities of Russian pork producers facing PRRS problem.

One of the aspects of the vaccine improvement is searching and implementation of new immune response modifiers and sorbents having apparent biological affinity [5, 7, 10].

Natural chitosan possesses such qualities as high sorption capacity, nontoxicity, and bacteriostatic activity [2]. It is also a good flocculant, and a thickening agent and its low molecular fractions obtained from high molecular weight natural raw materials by chemical and enzymic hydrolysis possess vivid immunomodulating characteristics due to their capability to promptly activate the production of immune response associated proteins. That's why the attempt to improve the inactivated PRRS vaccine using chitosan is a topical task [1].

## MATERIALS AND METHODS

1–1,5 month old piglets, 15–20 kg BW, from infectious disease free farms were used in the investigation.

Experimental pigs were quarantined for 7 days. They were subject to daily clinical examination and temperature check.

SEPPIC™ (France) products, well established in the Russian market, were used as adjuvants. In particular Montanide ISA 70 VG™ и Montanide ISA 206 VG™ are recommended for use in pig production.

Montanide ISA 206 VG adjuvant were sterilized using Sartobran sterilizing filter (Sartorius), at least, 0,22 µm diameter. Montanide ISA 70 VG adjuvant, batch U40218 36018A, was sterilized in autoclave in compliance with the producer's recommendations (at 121°C and 1,0 atm for 40 min)

European PRRS virus strain «KPR-96» deposited in FGBI «VGNKI» in 2004 and grown in the monolayer of the monkey kidney Marc-145 continuous cell line was used in the experiment.

Sterile form of chitosan succinate (hereafter chitosan) (ZAO Bioprogress, Schelkovo) was added to inactivated antigen water solution to reach the final 0,25% concentration.

Samples with chitosan or without it were prepared in compliance with adjuvant producer's recommendations: № 1 – based on Montanide ISA 206 VG; № 2 – based on Montanide ISA 206 VG + chitosan; № 3 – based on Montanide ISA 70 VG + chitosan; № 4 – based on Montanide ISA 70 VG.

All prepared vaccine samples were administered intramuscularly in doses of 2 cm<sup>3</sup> per animal. Within the next 10 days the skin at the site of the vaccine administration was palpated for hyperemia, hyperthermia or swell. Rectal temperature was also measured.

Revaccination was performed in 21 days post vaccination. The specified above method was used to perform repeated clinical diagnosis of the local reaction and daily thermometry.

Blood samples were collected from animals. Prepared blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using ELISA and neutralization test prior to vaccination, prior to revaccination (21 days), 14, 21, and 42 days after it. Blood sera were prepared by blood sample centrifuging (1500 g, 4°C) for 30 minutes and kept at -20°C till the analysis was performed.

Swine blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using commercial Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus Antibody Test Kit™ (IDEXX™, Europe) according to the attached package insert and NT according to the standard method [4].

Experimental animals were slaughtered in 63 days post vaccination with subsequent autopsy and thorough examination of the administration site.

## RESULTS AND DISCUSSION

5 groups of 4 piglets were used in the experiment. One of the randomly selected groups was used as a control group. All specified above groups were kept separately from each other.

Hyperthermia was observed in several animals in 24 hours post vaccination. Thus, body temperature increased to (40,8±0,2)°C in 2 out of 4 piglets vaccinated with preparation № 2. Hyperthermia (40,4±0,1)°C was observed in 3 piglets injected with experimental sample № 3 in the time specified. In appetite, low appetite and other abnormalities were not observed in animals.

Fig. 2. Lesions at sample № 2 injection site in a piglet

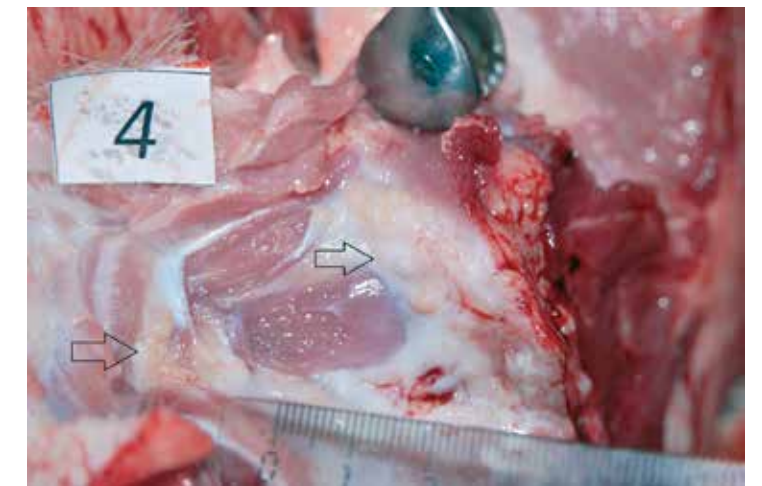
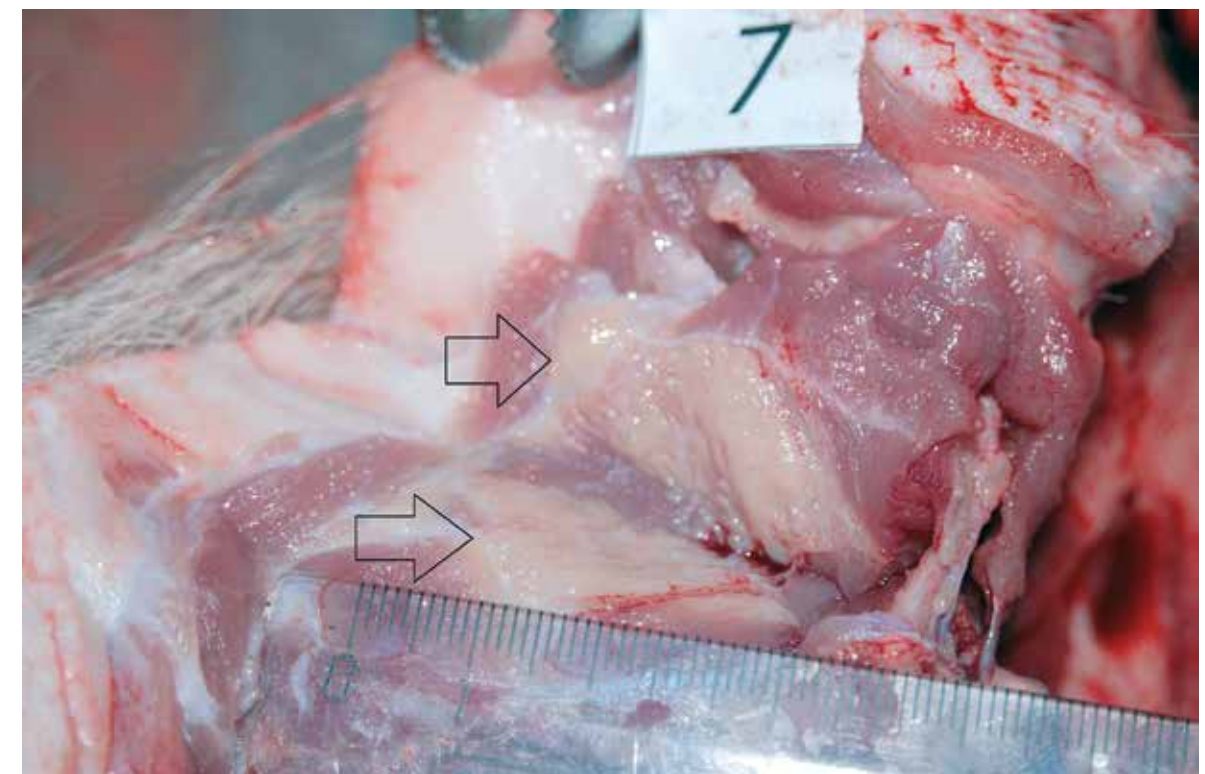


Fig. 1. Lesions at sample № 1 injection site in a piglet

In 24 hours after the repeated administration of the vaccine temperature increased to more than 40°C in 2 piglets of the group vaccinated with preparation № 2, and in 1 piglet of the group vaccinated with preparation № 3. No abnormalities (including inappetence, low appetite, etc.) were observed. Hereafter the experimental animals remained healthy within the whole observation period.

At the end of the experiment all animal were subject to diagnostic humane slaughter with subsequent autopsy.

Considerable proliferation of loose connective tissue (2,0×3,5 cm) pierced with small drops of the tested preparation («roe») was observed at the administration site in piglets injected with vaccine sample № 1 (Fig. 1).

Considerable lesions of connective tissue pierced with the vaccine bubbles were observed in animals injected with vaccine sample № 2. The total area of lesions considerably exceeded 3 cm<sup>2</sup> (Fig. 2).

Slight lesions of connective tissue with formation of vaccine depot at the site of injection were observed in pigs injected with vaccine sample № 3. The total area of lesions did not exceed 1 cm<sup>2</sup> (Fig. 3).

Slight lesions of connective tissue with formation of vaccine depot at the site of injection were observed in piglets injected with vaccine sample № 4. The total area of lesions was 0,9–1,5cm<sup>2</sup> (Fig. 4).



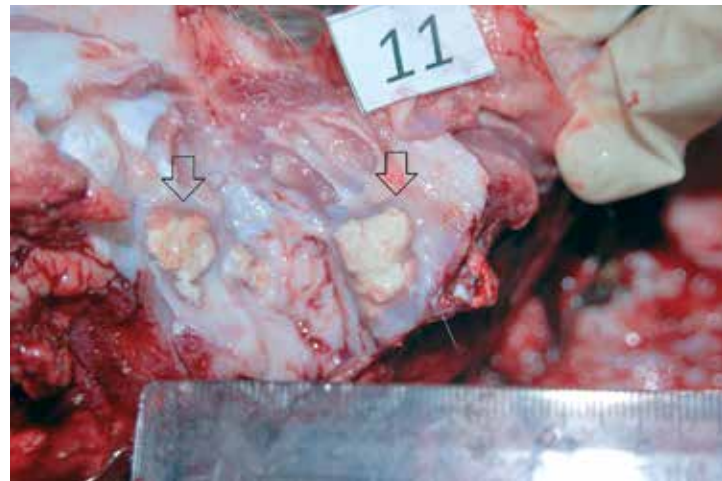


Fig. 3. Lesions at sample № 3 injection site in the experimental animal № 11

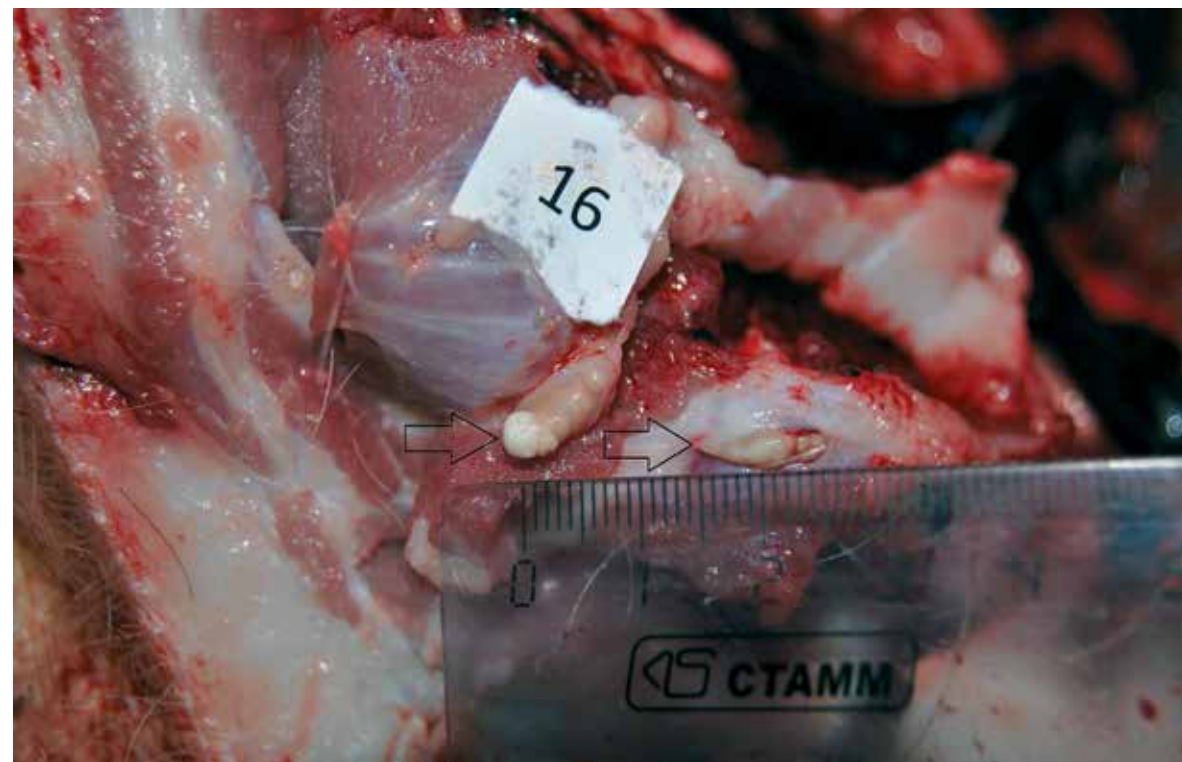
Blood samples were taken from animals prior to immunization, prior to revaccination (21 days), in 14 days post revaccination, on day 21 and upon completion of the experiment. Then blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using ELISA and NT. The test results are demonstrated in the table below.

The data presented in the table show that prior to vaccination antibodies to PRRS were not detected in pig blood sera.

In 21 days post vaccination specific antibodies to PRRS virus were not detected by ELISA in blood sera of experimental animals vaccinated with vaccine samples № 1 and № 2. Mean optical density values (s/p) equaled 0,04 and 0,06 respectively. At the same time specific antibodies to PRRS virus were detected in animals vaccinated with samples № 3 and № 4; mean s/p values were 0,83 and 0,65, respectively.

In 14, 21 and 42 days post revaccination level of antigenicity to PRRS virus in blood sera of experimental animals vaccinated with samples № 1 and № 2 practically did not change. Positive dynamics of specific antibody accumulation was observed in groups vaccinated with samples № 3 and № 4: mean s/p values were 1,6–2,6 and 1,04–2,25 respectively.

Fig. 4. Lesions at sample № 4 injection site in a pig



Therefore, absence of specific antibodies in animals vaccinated with samples № 1 and № 2 may be indicative of the low Montanide ISA 206 VG adjuvanticity which could not be improved by chitosan addition.

At the same time the level of specific antibodies to PRRS virus in animals immunized with vaccine samples based on Montanide ISA 70 VG adjuvant with or without chitosan confirms high antigenicity of preparations and stable positive dynamics of antibody development in vaccinated pigs at all sampling stages.

**CONCLUSIONS**

1. Results of the performed tests demonstrated short temperature increase within the physiological range in all pigs after administration of the experimental vaccine samples which was not harmful for experimental animals.

2. Postmortem examination of pigs vaccinated with preparations based on Montanide ISA 206 VG adjuvant with or without chitosan revealed considerable proliferation of loose connective tissue at the vaccine injection site. Herewith, this group of animals did not demonstrate sufficient development of specific antibodies for animal protection. At the same time considerable increase in virus neutralizing antibody level accompanied with small vaccine depot formation at the vaccine administration site, capable to develop strong and lasting immunity, was observed in blood of animals immunized with Montanide ISA 70 VG-based vaccine with chitosan or without it in 1,5 months post revaccination.

3. Dynamics of specific antibody titer increase in group 3 under initially equal adjuvant use conditions considerably exceeds such in group 4 which may demonstrate positive role of water-soluble chitosan in improvement of inactivated vaccines against PRRS.

**REFERENCES**

1. Chitosan influence on immune and endocrine system of piglets / A.A. Buyanov, V.N. Videnin, A.N. Grechuhin, V.D. Nifantov // Veterinariya. – 2004. – № 2. – P. 47–51.  
 2. Vorobyeva A.A., Medunitsin N.V. New principles and methods of immunobiological preparation development // Medicina. – 1999. – № 10. – P. 16–17.  
 3. Genetic variability of PRRS virus. / A.V. Scherbakov, V.F. Kovaloshin, V.A. Pylnov [et al.] // Topical issues

**Table**  
Study of antigenicity of inactivated, emulsion vaccines against PRRS using SEPPIC adjuvants and chitosan

No Experimental vaccine sample	No animal	Antigenicity by ELISA – s/p values*; By neutralization test – log <sub>2</sub>									
		Prior to vaccination		21 days post vaccination **		14 days post vaccination		21 days post vaccination		42 days post revaccination	
		ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT
№1 (ISA 206)	1	0,01	<2,0	0,08	<2,0	0,09	<2,0	0,09	2,0	0,09	2,0
	2	0,02	***	0,02	-	0,03	3,25	0,04	3,25	0,09	3,0
	3	0,02	-	0,02	-	0,03	<2,0	0,03	3,0	0,03	3,0
	4	0,02	-	0,03	-	0,03	3,0	0,03	3,0	0,04	2,75
		<b>0,02±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,04±0,002</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,045±0,001</b>	<b>2,5±0,002</b>	<b>0,05±0,001</b>	<b>2,8±0,002</b>	<b>0,06±0,001</b>	<b>2,7±0,004</b>
№2 (ISA 206+chitosan)	5	0,01	<2,0	0,04	-	0,06	3,25	0,08	3,25	0,2	3,25
	6	0,02	-	0,06	-	0,06	3,0	0,09	3,0	0,15	3,25
	7	0,02	-	0,05	-	0,08	<2,0	0,13	3,75	0,16	3,0
	8	0,05	-	0,1	<2,0	0,2	<2,0	0,4	3,0	0,5	3,0
		<b>0,02±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,06±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,1±0,003</b>	<b>2,5±0,002</b>	<b>0,2±0,001</b>	<b>3,25±0,002</b>	<b>0,3±0,001</b>	<b>3,1±0,002</b>
№3 (ISA 70 +chitosan)	9	0,03	-	0,8	5,25	0,7	7,5	1,8	7,75	2,71	8,5
	10	0,02	-	1,5	7,0	1,5	8,0	2,4	8,5	2,64	8,5
	11	0,01	-	0,3	7,0	2,2	8,5	1,9	9,0	2,0	8,75
	12	0,02	-	0,74	7,0	2,0	7,75	2,4	8,5	3,0	8,75
		<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,83±0,003</b>	<b>6,56±0,002</b>	<b>1,6±0,001</b>	<b>8,0±0,004</b>	<b>2,1±0,002</b>	<b>8,4±0,005</b>	<b>2,6±0,001</b>	<b>8,6±0,002</b>
№4 (ISA 70)	13	0,02	-	0,7	4,75	0,97	5,7	1,2	5,75	2,4	6,0
	14	0,02	-	0,4	5,0	1,1	6,0	1,9	6,0	2,1	6,25
	15	0,01	-	0,6	5,75	0,8	6,25	2,0	6,5	2,3	6,5
	16	0,06	-	0,9	5,5	1,3	6,0	1,4	6,0	2,2	7,25
		<b>0,03±0,001</b>	-	<b>0,65±0,003</b>	<b>5,25±0,004</b>	<b>1,04±0,001</b>	<b>6,0±0,005</b>	<b>1,6±0,002</b>	<b>6,1±0,006</b>	<b>2,25±0,003</b>	<b>6,5±0,004</b>
Control	17	0,03	-	0,01	<2,0	0,01	-	0,03	-	0,03	-
	18	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-
	19	0,01	-	0,04	-	0,01	-	0,02	-	0,03	-
	20	0,03	-	0,05	-	0,02	-	0,01	-	0,04	-
		<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,03±0,001</b>	<b>0,5±0,003</b>	<b>0,015±0,002</b>	-	<b>0,02±0,001</b>	-	<b>0,03±0,003</b>	-

\* value s/p < 0,4 –positive; \*\* revaccination; \*\*\* undetectable virus neutralizing antibody value in the reaction.

of animal infectious pathology: Proceedings of the International Scientific Conference devoted to the 45<sup>th</sup> Anniversary of the VGI «ARRIAH». – Vladimir, 2003. – P. 150–155.

4. Neutralization test method for retrospective PRRS diagnosis / T.Z. Baibikov, L.G. Zhuchkova, Sh.K. Kulyashbekova, V.L. Gavrilova; ARRIAH. – Vladimir, 1995. – 5 p.

5. Nudga L.A. Chitin and chitosan derivatives and their characteristics // Chitin and chitosan. Production, characteristics and usage. – M., 2002. – P. 141–142.

6. Porcine reproductive respiratory syndrome (“blue ear”) / V.A. Mischenko, V.M. Avilov, V.M. Zakharov [et. al.] // Veterinariya. – 1994. – № 9. – C. 22–24.

7. Chitosan – mediated stimulation of macrophage function / G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri [et al.] // Biomaterials. – 1994. – Vol. 15, № 15. – P. 1215–1220.

8. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody / E.M. Bautista, S.M. Goyal, I.J. Yoon [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1993. – Vol. 5, № 2. – P. 163–165.

9. Morin M., Robinson Y. Causes of mystery swine disease // Can. Vet. J. – 1992. – Vol. 33, № 1. – P. 6.

10. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.-W. Cho, Y.-N. Cho, S.-H. Chung [et al.] // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20, № 22. – P. 2139–2145.



# МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2012–2014 ГГ.

А.В. Потехин<sup>1</sup>, В.С. Русалеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: potehin@arriah.ru

<sup>2</sup> ученый секретарь, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: rusaleev@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Проведен мониторинг антибиотикорезистентности 42 изолятов возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней, выделенных на территории Российской Федерации с 2012 по 2014 гг. Большинство из них оказались чувствительными к пенициллину (85,7%), к аминопенициллинам (92,9%), к цефалоспорином III–IV поколения (100%), энрофлоксацину (81,0%), эритромицину (85,7%) и флорфениколу (95,2%). К антибиотикам тетрациклиновой группы, сульфаниламидам и триметоприму большая часть изолятов проявила резистентность.

Ключевые слова: актинобациллезная плевропневмония свиней, изоляты, антибактериальные препараты.

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие свиноводства в Российской Федерации ставит перед ветеринарной наукой ряд задач, связанных с совершенствованием средств специфической профилактики и лечения инфекционных болезней свиней. Большое значение приобретает лекарственная терапия, и в первую очередь использование химиотерапевтических средств, позволяющих значительно снизить ущерб, причиняемый заболеваниями бактериальной этиологии.

Актонобациллезная плевропневмония свиней — это инфекционное контагиозное заболевание, характеризующееся геморрагической, фибринозно-геморрагической и гнойно-некротизирующей пневмонией, а также серозно-фибринозным плевритом, перикардитом и артритом [3, 4]. При появлении этого заболевания в хозяйстве возникает необходимость проведения неотложной антибактериальной терапии.

Несмотря на высокую чувствительность возбудителя к большому спектру антибиотиков, лечебные мероприятия не всегда дают положительные результаты. Эффективность антибиотикотерапии зачастую варьирует в различных хозяйствах. Терапевтическое действие лекарственных препаратов во многом зависит от стадии болезни, в которой они применяются. Так, при наличии

обширных некротических очагов в легочной ткани результативность антибиотикотерапии незначительная. При сверхостром и остром течении болезни лечение эффективно только на ранних ее стадиях. В связи с этим необходим повседневный тщательный контроль за состоянием поголовья неблагополучных ферм. В крупных свиноводческих хозяйствах промышленного типа это осуществлять трудно. В данном случае положительный результат достигается преимущественно при профилактических обработках животных неблагополучных групп в целом. Очень часто в хозяйствах с профилактической и лечебной целями используется введение в корм антибиотиков тетрациклиновой группы, однако предупредить и купировать болезнь таким способом не всегда удается, особенно если возбудитель проявляет к ним слабую чувствительность или резистентность. Безуспешными также оказываются попытки дачи антибиотиков с кормом с целью санации бактерионосителей [2, 3, 5].

Традиционные противобактериальные препараты не всегда удовлетворяют современным требованиям из-за недостаточной эффективности, становится актуальным вопрос мониторинга структуры и уровня лекарственной устойчивости микроорганизмов. Эмпирическая антибиотикотерапия отдельных инфекционных болезней свиней должна учитывать фактические данные эпизоотологического мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов, циркулирующих в конкретных хозяйствах.

Целью работы являлось определение антибиотикорезистентности изолятов актинобациллезной плевропневмонии свиней, выделенных в Российской Федерации с 2012 по 2014 гг.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней из патологического материала проводили бактериологическим методом в соответствии с «Временными методическими указаниями по лабораторной диагностике гемофильной плевропневмонии свиней» [1]. Идентификация возбудителя

заболевания была основана на определении тинкториальных, культурально-морфологических и основных биохимических свойств.

Чувствительность изолятов к антибактериальным препаратам тестировали диско-диффузионным методом по рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI, США) [7]. Для оценки воспроизводимости и точности процедуры определения чувствительности параллельно с испытуемыми изолятами использовали референтный штамм *A. pleuropneumoniae* № 27089 Американской коллекции типовых культур (АТСС) с хорошо изученными фенотипическими свойствами, в том числе и уровнем чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП).

Чувствительность штамма и изолятов *A. pleuropneumoniae* к АБП определяли на питательном агаре НТМ (*Haemophilus test medium*) с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота и раствора никотинамида аденин динуклеотида.

В работе использовали диски АБП различных производителей (Oxoid, KRKA, Bio-Rad, BD, Himedia), содержащие: пенициллин (6 µg — 10 ед), ампициллин (10 µg), амоксициллин (10 µg), амоксициллин с клавулановой кислотой (30 µg), цефтриаксон (30 µg), цефепим (10 µg), цефотаксим (30 µg), энрофлоксацин (5 µg), цiproфлоксацин (5 µg), флюмеквин (30 µg), эритромицин (15 µg), тилозин (15 µg), спирамицин (50 µg), тетрациклин (30 µg), хлортетрациклин (30 µg), окситетрациклин (30 µg), доксициклин (30 µg), котримоксазол (25 µg), триметоприм (5 µg), колистин (100 µg) и флорфеникол (30 µg). Кроме того, использовали Е-тест на тиамулин (0,002–32 µg/ml).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на обилие противомикробных препаратов, респираторные инфекции бактериальной этиологии чрезвычайно распространены в свиноводческих хозяйствах промышленного типа. За 2012–2014 гг. бактериологическим методом из патологического материала выделено и исследовано 42 изолята возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней. Большинство исследуемых изолятов (≥85,7%) оказались чувствительными к природному и полусинтетическим пенициллинам, включая ингибиторозащищенные. Резистентность к пенициллинам была выявлена всего у 6 изолятов, причем у 3 она была связана с наличием β-лактамазы. Все исследуемые изоляты оказались чувствительными к цефалоспорином III–IV поколения, однако использование данных препаратов в ветеринарии в настоящее время ограничено из-за их высокой стоимости. К гентамицину чувствительными оказались только 21,4% изолятов, тогда как 78,6% проявили умеренную резистентность. Результаты определения чувствительности к АБП представлены в таблице.

К группе фторированных хинолонов большая часть изолятов показала высокую чувствительность, за исключением флюмеквина. Эффективными в отношении возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней оказались препараты группы макролидов. К препаратам тетрациклинового ряда менее половины всех исследуемых изолятов проявили чувствительность и почти столько же — резистентность. Данное обстоятельство, возможно, связано с повсеместным использованием тетрациклинов с кормом не только для лечения, но и для профилактики различных инфекционных заболеваний свиней, а также для стимуляции

Таблица  
Чувствительность изолятов *A. pleuropneumoniae* к АБП

№ п/п	Антимикробный препарат, концентрация, мкг	Доля изолятов, %		
		S	I	R
1	Пенициллин, 6	85,7	0	14,3
2	Ампициллин, 10	92,9	0	7,1
3	Амоксициллин, 10	92,9	0	7,1
4	Амоксициллин с клавулановой кислотой, 30	95,2	0	4,8
5	Цефтриаксон, 30	100	0	0
6	Цефепим, 30	100	0	0
7	Цефотаксим, 30	100	0	0
8	Гентамицин, 10	21,4	78,6	0
9	Энрофлоксацин, 5	81,0	4,7	14,3
10	Цiproфлоксацин, 5	90,4	4,8	4,8
11	Флюмеквин, 30	42,9	21,4	35,7
12	Эритромицин, 15	85,7	14,3	0
13	Тилозин, 15	76,2	23,8	0
14	Спирамицин, 50	71,4	28,6	0
15	Тетрациклин, 30	7,1	11,9	81,0
16	Хлортетрациклин, 30	45,2	7,2	47,6
17	Окситетрациклин, 30	38,1	16,7	45,2
18	Доксициклин, 30	38,1	9,5	52,4
19	Котримоксазол, 25	45,2	7,2	47,6
20	Триметоприм, 5	42,8	7,2	50,0
21	Флорфеникол, 30	95,2	0	4,8
22	Тиамулин, 0,002-32	69,0	7,2	23,8

S — чувствительных, I — умеренно резистентных, R — резистентных.

роста. Многочисленные результаты исследований, полученные в разных странах мира, свидетельствуют о негативных последствиях долгосрочного использования тетрациклинов в субтерапевтических дозах. В Испании количество изолятов *A. pleuropneumoniae*, резистентных к окситетрациклину, составляет более 70%, в Румынии — около 100%, в Южной Корее — 80%, в США и Канаде — более 70% [2, 3, 5, 6]. Такая же картина наблюдается по сульфаниламидным препаратам в комплексе с триметопримом и отдельно по триметоприму.

Одним из «последних» антибиотиков, введенных в ветеринарную практику, является флорфеникол. Более 95% изолятов показали чувствительность к данному препарату, и в то же время уже у двух изолятов обнаружена резистентность. По тиамулину результат оказался неоднозначным. Минимальная ингибирующая концентрация у 69% чувствительных изолятов составляла от 0,25 до 3,0 мкг/мл, а у 23,8% резистентных — 8,0 мкг/мл и более (рисунок).

При использовании АБП следует помнить, что длительное бесконтрольное применение противомикробных средств снижает их терапевтическую эффективность и приводит к появлению устойчивых к ним форм микроорганизмов. АБП в зависимости от их химико-фармакологической характеристики всегда должны назначаться курсом согласно действующим инструкциям по их применению.





Рис. Зоны задержки роста изолята *A. pleuropneumoniae* препаратами: а) пенициллиновой группы, б) тетрациклиновой группы, в) тиамулином

Иногда для выделения возбудителя актинобациллёзной плевропневмонии свиней и определения его чувствительности к антимикробным препаратам требуется продолжительное время, поэтому лечение животных должно быть начато на основании предварительного диагноза. При этом необходимо использовать препараты широкого антимикробного спектра действия. После постановки окончательного диагноза следует решить вопрос о целесообразности назначения другого препарата, в том числе и узкого спектра действия, к которому наиболее чувствителен возбудитель данного заболевания.

Если возбудитель чувствителен сразу к нескольким имеющимся в распоряжении препаратам, лечить следует широко распространенными антимикробными средствами, например пенициллином, амоксициллином, эритромицином и т.п. Другие препараты можно оставить в резерве, используя их только по окончании эффективного действия ранее применявшихся. Лучше назначать бактерицидные, а не бактериостатические препараты. Последние блокируют репликацию и деление клеток, не вызывая их гибели; клетки сохраняют способность к росту, и при низкой резистентности организма возможен рецидив заболевания. Бактерицидное действие характеризуется гибелью клеток в присутствии препарата.

Учитывая глобальную угрозу распространения антибиотикорезистентных штаммов в животноводстве и прямую связь этого явления с чрезмерным использованием антибиотиков, в некоторых странах сформулировали стратегию ограничительной политики применения антибиотиков при ряде инфекций как реальную меру сдерживания резистентности. Основная цель данной концепции заключается в ограничении неоправданного назначения антибиотиков.

Одним из действенных способов ограничения использования антибиотиков, очевидно, является специфическая профилактика актинобациллёзной плевропневмонии свиней. С теоретических позиций применение вакцин против данного заболевания, приводящее к снижению заболеваемости и смертности, должно способствовать ограничению применения антибиотиков.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большой арсенал антибактериальных препаратов, разработанных и внедренных в ветери-

нарную практику, лечение актинобациллёзной плевропневмонии свиней продолжает оставаться одной из актуальных проблем ветеринарии. Одной из причин недостаточной эффективности антибактериальной терапии является то, что широкое использование антибиотиков способствует росту резистентности возбудителя к традиционным антибактериальным препаратам.

Для проведения эмпирической антимикробной терапии актинобациллёзной плевропневмонии свиней в настоящее время можно рекомендовать  $\beta$ -лактамы, фторхинолоны, макролиды, флорфеникол и тиамулин. Сравнительно высокий уровень резистентности к антибиотикам тетрациклиновой группы, сульфаниламидным препаратам и триметоприму (более 30%) ограничивает возможности их применения для эффективного лечения заболевания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временные методические указания по лабораторной диагностике гемофильной плевропневмонии свиней: утв. ГУВ МСХ СССР 16 апреля 1981 г. №115-6а.
2. Blanco M. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain // Antimicrobial Agent and Chemotherapy. — 2006. — Vol. 50, № 2. — P. 702–708.
3. Gottschalk M., Taylor T. *Actinobacillus pleuropneumoniae* // Diseases of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. — 9th ed. — Ames, Iowa, 2006. — P. 563–576.
4. Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence // American Association of Swine Veterinarians, 2007. — P. 381–384.
5. Pascu C. Monitoring of antibiotic resistance in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the west parth of Romania between 2005 and 2009 // Lucrari Stintifice. Seria Medicina Veterinara. — 2010. — Vol. XLIII (1). — P. 173–176.
6. Portis E. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010 // J. Swine Health Prod. — 2013. — Vol. 21 (1). — P. 30–41.
7. Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. M31-A3 / Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). — 3rd ed. — Wayne, PA, USA, 2008. — 128 p.

# MONITORING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* ISOLATED IN THE RUSSIAN FEDERATION IN 2012–2014

A.V. Potekhin<sup>1</sup>, V.S. Rusaleyev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: potekhin@arriah.ru

<sup>2</sup> Scientific Secretary, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: rusaleyev@arriah.ru

### SUMMARY

Antibiotic resistance of 42 porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates recovered from pigs in the Russian Federation in 2012–2014 has been monitored. Most of them proved to be sensitive to penicillins (85,7%), aminopenicillins (92,9%), III–IV-generation cephalosporins (100%), enrofloxacin (81,0%), erythromycin (85,7%) and florfenicol (95,2%). The majority of the isolates demonstrated resistance to tetracyclines, sulfanilamides and trimethoprim.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, isolates, antibacterial preparations.

### INTRODUCTION

Pig industry development in the Russian Federation places veterinary science before a number of challenges related to the improvement of drugs for specific prevention and control of porcine infectious diseases. Of crucial importance is drug therapy and first of all use of chemotherapeutic drugs allowing for significant reduction of damage induced by the bacterial diseases.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a contagious disease involving hemorrhagic, fibrinous-haemorrhagic and pleuro-necrotising as well as serofibrinous pleurisy, pericarditis and arthritides [3, 4]. In case of the disease emergence on a farm urgent antibacterial treatment is needed.

In spite of high sensitivity of the agent to the wide range of antibiotics the remedial actions do not always ensure positive results. The efficiency of the antibiotic use often varies on different farms. Therapeutic action of the drugs mainly depends on the disease stage, during which they are administered. Thus in case of extensive necrosis of the lung tissues the effect of the antibiotics will be insignificant. In case of peracute and acute disease the treatment is effective only at early stages. Therefore daily

monitoring of population on the infected farms is essential. It may be problematic in large commercial pig holdings. In such case positive result can be generally gained from total preventive treatment of animals in the infected group. Tetracyclines are very often introduced into feed for prevention and treatment on the farms, however they are not always useful for the disease prevention or containment especially when the agent is low sensitive or resistant to such antibiotics. Efforts to administer antibiotics with feed for the purpose of the bacteria carriers' sanitation are also ineffective [2, 3, 5].

Traditional antibacterial drugs are not always compliant with current requirements due to their insufficient efficacy and the issue of monitoring of the structure and level of microorganisms' resistance to drugs becomes of concern. Empiric treatment of an individual infectious disease with antibiotics should consider actual data of the epidemic monitoring of antibiotic resistance of microorganisms circulating on individual farms.

The work was aimed at determination of the antibiotic resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates recovered from pigs in the Russian Federation in 2012–2014.



**MATERIALS AND METHODS**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* was isolated from pig materials using bacteriological technique in compliance with Provisional Methodic Instructions for Laboratory Diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Pigs [1]. The disease agent identification was based on determination of its tinctorial, cultural-morphological and general biological properties.

The isolates' sensitivity to the antibacterial preparations was tested using disk-diffusion method recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, USA) [7]. *A. pleuropneumoniae* reference strain No. 27089 provided by the American Type Culture Collection (ATCC) and having well described phenotypic properties including level of sensitivity to antibacterial preparations (ABP) was used in parallel with the tested isolates for the purpose of the test reproducibility and precision evaluation.

Sensitivity *A. pleuropneumoniae* strain and isolates to ABP was determined in nutrient HTM agar (*Haemophilus test medium*) supplemented with bovine sera and nicotinamide-adenine dinucleotide.

ABP disks from various manufacturers were used (Oxoid, KRKA, Bio-Rad, BD, Himedia). The disks contained penicillin (6 µg – 10 units), ampicillin (10 µg), amoxicillin (10 µg), amoxicillin with clavulanic acid (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefepime (10 µg), cefotaxime (30 µg), enrofloxacin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), flumequine (30 µg), erythromycin (15 µg), tylosin (15 µg), spiramycin (50 µg), tetracycline (30 µg), chlortetracycline (30 µg), oxytetracycline (30 µg),

doxycycline (30 µg), co-trimoxazole (25 µg), trimethoprim (5 µg), colistin (100 µg) and florfenicol (30 µg). In addition, E-test for tiamulin was used (0,002–32 µg/ml).

**RESULTS AND DISCUSSION**

In spite of great number of antimicrobial preparations bacterial infections of respiratory tract are extremely wide spread in the commercial pig holdings. Over 2012–2014, forty-two *A. pleuropneumoniae* isolates were recovered and examined by bacteriological techniques. The majority of tested isolates (≥85,7%) proved to be sensitive to natural and semisynthetic penicillins including inhibitor protected ones. Resistance to penicillins was detected only in 6 isolates and in 3 isolates it was associated with β-lactamase. All tested isolates were sensitive to III-IV generation cephalosporin but currently use of such preparations in veterinary practice is limited due to their high cost. Only 21,4% of isolates were sensitive to gentamicin while 78,6% demonstrated moderate resistance. Summary results of sensitivity to ABP are demonstrated in the Table.

Most part of the isolates demonstrated high sensitivity to fluoroquinolones excluding flumequine. Macrolides proved to be effective against *A. pleuropneumoniae*. Less than half of tested tetracyclines demonstrated sensitivity and nearly the same amount of tetracyclines demonstrated resistance. This fact could be related to general administration of tetracyclines with feed not only for therapeutic purposes but also for prevention of various pig diseases and for growth promotion. Multiple test results from the whole world are indicative of negative consequences of long term use of tetracyclines in subtherapeutic doses. In

**Table**  
Sensitivity of *A. pleuropneumoniae* isolates to ABP

No.	Antimicrobial preparation, concentration, µg	Part of isolates, %		
		S	I	R
1	Penicillin, 6	85,7	0	14,3
2	Ampicillin, 10	92,9	0	7,1
3	Amoxicillin, 10	92,9	0	7,1
4	Amoxicillin with clavulanic acid, 30	95,2	0	4,8
5	Ceftriaxone, 30	100	0	0
6	Cefepime, 30	100	0	0
7	Cefotaxime, 30	100	0	0
8	Gentamicin, 10	21,4	78,6	0
9	Enrofloxacin, 5	81,0	4,7	14,3
10	Ciprofloxacin, 5	90,4	4,8	4,8
11	Flumequine, 30	42,9	21,4	35,7
12	Erythromycin, 15	85,7	14,3	0
13	Tylosin, 15	76,2	23,8	0
14	Spiramycin, 50	71,4	28,6	0
15	Tetracycline, 30	7,1	11,9	81,0
16	Chlortetracycline, 30	45,2	7,2	47,6
17	Oxytetracycline, 30	38,1	16,7	45,2
18	Doxycycline, 30	38,1	9,5	52,4
19	Co-trimoxazol, 25	45,2	7,2	47,6
20	Trimethoprim, 5	42,8	7,2	50,0
21	Florfenicol, 30	95,2	0	4,8
22	Tiamulin, 0,002-32	69,0	7,2	23,8

S – sensitive, I – moderately sensitive, R – resistant.

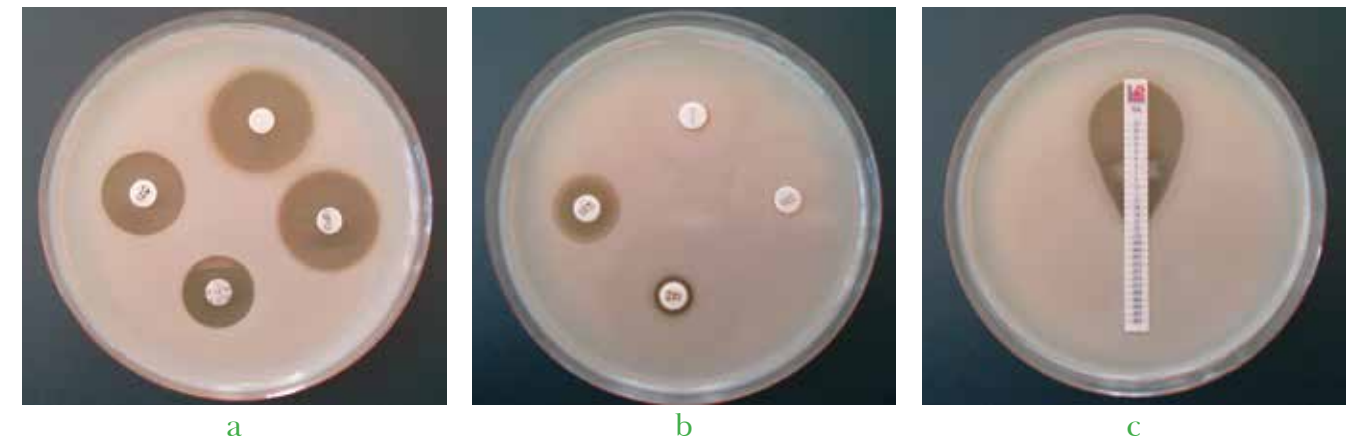


Figure. Areas of *A. pleuropneumoniae* growth inhibition associated with: a) penicillins, b) tetracyclines, c) tiamulin

Spain the number of *A. pleuropneumoniae* oxytetracycline-resistant isolates amounts to 70%, in Romania – to about 100%, in South Korea – to 80%, and in the USA and Canada – to over 70% [2, 3, 5, 6]. The same is the case for sulfonamides combined with trimethoprim and for trimethoprim alone.

One of the newest antibiotics introduced in veterinary practice is florfenicol. Over 95% of isolates demonstrated sensitivity to the preparation meanwhile two isolates were resistant. Tiamulin result was ambiguous. Minimal concentration for 69% sensitive isolates amounted to 0,25–3,0 µg/ml and for 23,8% resistant ones – to 8,0 µg/ml and more (see Figure).

While using ABP one should keep in mind that long term and uncontrolled use of antimicrobials reduces their therapeutic efficacy and leads to emergence of microorganisms resistant to them. Depending on the ABPs' chemical and pharmacological properties they should be administered as a course and according to the package insert.

Sometimes it takes a long time to isolate *A. pleuropneumoniae* and to determine its sensitivity to antimicrobial preparations. Therefore the animal treatment should be started basing on the presumptive diagnosis. In such a case broad-spectrum antimicrobial preparations should be used. As soon as final diagnosis is confirmed it should be discussed whether it is practical to administer some other drug including narrow-spectrum preparation to which the disease agent is the most sensitive.

When the agent is sensitive to several available preparations, treatment should be performed by means of widely used antimicrobial drugs, e.g. penicillin, amoxicillin, erythromycin, etc. Other preparation can be reserved and used only after the previous preparation effect termination. Bactericides should be used instead of bacteriostatics as the latter block the cell replication and mitosis but do not cause cellular death and the cells retain their growth potential and can lead to the disease recurrence in case of low body resistance. Bactericidal effect involves the cell death associated with the preparation.

In view of global threat of the antibiotic-resistant strains' spread in farm animals and direct relation of this fact to excessive use of antibiotics, a strategy aimed at limitation of use of antibiotic in case of a number of infections has been developed in some countries as an actual measure for resistance containment. The basic objective of such strategy is limitation of undue prescription of antibiotics.

Specific prevention of *A. pleuropneumoniae* in pigs is likely to be one of the efficient means to limit the use of antibiotics. From the theoretic point of view, the disease vaccination resulting in morbidity and mortality reduction should aid to limitation of the antibiotics' use.

**CONCLUSION**

In spite of a large number of antibacterial drugs developed and introduced in veterinary practice *A. pleuropneumoniae* control in pigs still remains one of the topical issues for Veterinary Medicine. One of the reasons of insufficient effect of antibacterial treatment is the fact that wide use of antibiotics results in increase of agent's resistance to the traditional antibacterial preparations.

B-lactams, fluoroquinolones, macrolides, florfenicol and tiamulin could be recommended for the purpose of empiric antibiotic therapy of pigs against *A. pleuropneumoniae*. Relatively high resistance (over 30%) to tetracyclines, sulfanilamides and trimethoprim limits their use for effective disease treatment.

**REFERENCES**

- Provisional methodical instructions for laboratory diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs: approved by SVD MOA USSR on April 16, 1981 № 115-6a.
- Blanco M. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain // Antimicrobial Agent and Chemotherapy. – 2006. – Vol. 50, № 2. – P. 702–708.
- Gottschalk M., Taylor T. *Actinobacillus pleuropneumoniae* // Diseases of Swine / ed. B.E. Straw [et al.]. – 9<sup>th</sup> ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 563–576.
- Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence // American Association of Swine Veterinarians, 2007. – P. 381–384.
- Pascu C. Monitoring of antibiotic resistance in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the west parth of Romania between 2005 and 2009 // Lucrari Stintifice. Seria Medicina Veterinara. – 2010. – Vol. XLIII (1). – P. 173–176.
- Portis E. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010 // J. Swine Health Prod. – 2013. – Vol. 21 (1). – P. 30–41.
- Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. M31-A3 / Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). – 3<sup>rd</sup> ed. – Wayne, PA, USA, 2008. – 128 p.



# РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА В КУРИНЫХ ЯЙЦАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.А. Луговской<sup>1</sup>, Д.С. Большаков<sup>2</sup>, Т.Б. Никешина<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lugovskoy@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>3</sup> заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Разработана методика одновременного определения 9 антибиотиков фторхинолонового ряда (марбофлоксацина, офлоксацина, пефлоксацина, норфлоксацина, цiproфлоксацина, энрофлоксацина, данофлоксацина, сарафлоксацина и дифлоксацина) в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. Диапазон определяемых содержаний фторхинолонов составил от 10 до 100 мкг/кг при массе образца 4 г. В результате валидационных исследований рассчитаны суммарная стандартная неопределенность и относительная расширенная неопределенность аналитических измерений. Методика позволяет определять остаточные содержания антибиотиков на уровне допустимых значений 100 мкг/кг в соответствии с СанПиН 2.3.2.2804-10 и «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)».

Ключевые слова: фторхинолоны, антибиотики, куриные яйца, высокоэффективная жидкостная хроматография, флуориметрическое детектирование, валидация.

# DEVELOPMENT AND VALIDATION OF FLUOROQUINOLONE DETECTION METHOD IN CHICKEN EGGS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.A. Lugovskoy<sup>1</sup>, D.S. Bolshakov<sup>2</sup>, T.B. Nikeshina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lugovskoy@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>3</sup> Head of the Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

## SUMMARY

The method for the simultaneous detection of nine fluoroquinolone antibiotics (marbofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin and difloxacin) in chicken eggs using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection was developed. The detected range of fluoroquinolones is from 10 to 100 µg/kg in a 4 g sample. Based on the validation studies the combined standard uncertainty and relative expanded uncertainty were calculated. The technique enables to detect antibiotic residues in their admissible levels equal to 100 µg/kg, in compliance with SanPiN 2.3.2.2804-10 and Common sanitary-epidemiological and hygienic requirements to the goods subject to sanitary and epidemiological surveillance (control).

Key words: fluoroquinolones, antibiotics, chicken eggs, high-performance liquid chromatography, fluorescence detection, validation.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время антибиотики широко используются в животноводстве для лечения и профилактики различных заболеваний сельскохозяйственных животных, а также в качестве кормовых добавок для увеличения их массы тела. Наличие остаточных количеств антибактериальных препаратов в продуктах питания животного происхождения представляет серьезную опасность для здоровья человека за счет проявления ярко выраженных токсических и аллергических свойств. Их нормирование на территории Российской Федерации осуществляется в соответствии с СанПиН 2.3.2.2804-10 «Дополнения и изменения № 22 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 27.12.2010 г. № 177), а также «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» (утверждены Решением Комиссии Таможенного союза № 299 от 28.05.2010 г).

Фторхинолоны (ФХ) являются растущей группой синтетических антибиотиков, используемых для лечения различных инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии. ФХ относятся к хинолонам второго поколения: их основное отличие заключается в наличии атома фтора в положении С-6 хинолонового фрагмента и/или пиперазинового кольца в положении С-7 (рис. 1), что повышает их общую антибактериальную активность.

В соответствии с действующей нормативной документацией, антибиотики в продуктах животного происхождения определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) [3, 5], микробиологическими [1, 4, 8] и хроматографическими [2, 6, 7, 9] методами. При использовании ИФА и проведении микробиологических исследований возможно качественное определение (обнаружение) пенициллинов, тетрациклинов, цефа-

лоспоринов, макролидов, β-лактамов и левомицетина (хлорамфеникола). Однако эти методы недостаточно специфичны, могут давать ложноположительные результаты, а продолжительность анализа достигает нескольких часов.

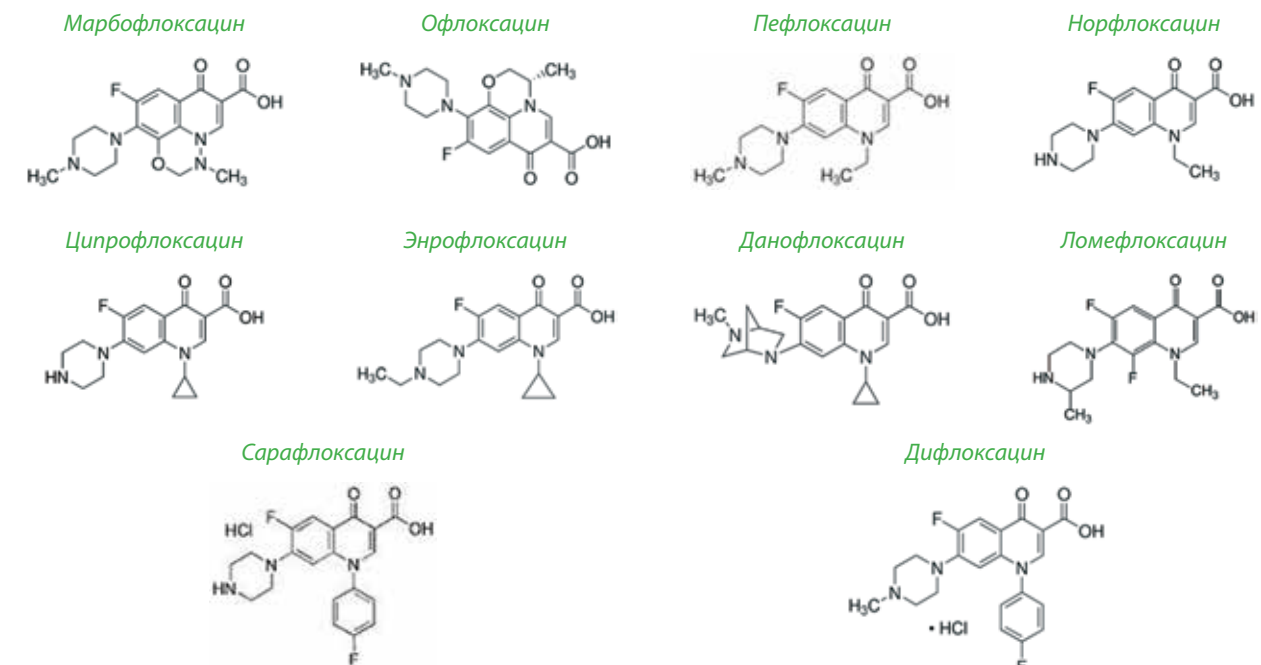
Для оценки количественного содержания антибиотиков в пищевых продуктах используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием [2, 6, 7, 9]. Существенным недостатком данного метода, ограничивающим его повсеместное использование, является высокая стоимость оборудования, расходных материалов и жесткие требования к качеству реактивов.

Для определения ФХ используют прежде всего хроматографические, реже электрофоретические методы. Анализ цельной крови [18], биологических жидкостей [14, 17, 19, 22], воды [20, 21, 23] проводят методом ВЭЖХ с УФ- [19, 22, 23], фотодиодноматричным [18], флуориметрическим [20–22] детектированием, детектированием с фотоиндуцированной флуоресценцией [17] после извлечения, концентрирования и очистки экстрактов методом твердофазной (ТФЭ) [20, 23], жидкостно-жидкостной экстракции [14] и твердофазной микроэкстракции [21]. С использованием метода капиллярного электрофореза проводят анализ молока [13], куриного мяса [12], воды [15] и биологических жидкостей [10, 11, 16]. Предложенные методики позволяют определять от 1 до 5 антибиотиков при совместном присутствии.

Цель данной работы состояла в разработке методики одновременного определения 9 антибиотиков фторхинолонового ряда (с использованием ломефлоксацина в качестве внутреннего стандарта) в куриных яйцах и оценки ее пригодности для применения в программе мониторинга остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах.

Для достижения поставленной цели выбран метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием, который не только широко распространен в лабораторной практике, но и имеет высокую чувствительность при проведении исследований. Концентрирование

Рис. 1. Структурные формулы определяемых антибиотиков фторхинолонового ряда





и очистку экстрактов проводили методом ТФЭ, позволяющим эффективно устранять мешающее влияние компонентов матрицы без использования большого количества органических растворителей.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Аппаратура.** В работе использовали жидкостные хроматографы Agilent LC 1200 (Agilent Technologies) и Flexar PDA FLD (PerkinElmer) с диодно-матричным и флуориметрическим детекторами, оснащенные программным обеспечением (ПО) Agilent ChemStation и Chromera соответственно. Разделение проводили на колонке SunFire C18 (3×100 мм; 3,5 мкм) с предколонкой SunFire C18 (3×20 мм; 3,5 мкм).

В процессе подготовки проб использовали ультрацентрифугу Mini Spin (Eppendorf, Германия), низкоскоростную центрифугу Rotanta 460R (HETTICH, Германия), лабораторный pH-метр-милливольтметр «pH-121» (Россия), шейкер Vibromax 110 (Heidolph, Германия), программируемый ротатор Multi RS-60 (Biosan, Латвия) и универсальный водный термостат BTW-U (Biosan, Латвия).

**Реагенты и материалы.** В работе применяли индивидуальные стандартные образцы следующих антибиотиков: марбофлоксацин (34039-100MG-R Vetranal), офлоксацин (33703-100MG-R Vetranal), пефлоксацин (C15905000 Dr Ehrenstorfer), норфлоксацин (33899-100MG-R Vetranal), цiproфлоксацин (33434-100MG-R Vetranal), энрофлоксацин (33699-100MG-R Vetranal), данофлоксацин (33700-100MG-R Vetranal), сарафлоксацин (33497-100MG-R Vetranal), дифлоксацин (33984-100MG-R Vetranal) и ломефлоксацин (L2906-1G Sigma) в качестве внутреннего стандарта.

Для приготовления подвижной фазы, буферных растворов и проведения пробоподготовки исполь-

зовали ацетонитрил (Криохром), метанол (Sharlau), тетрагидрофуран (ТГФ) (Roth), дихлорметан (ДХМ) (Panreac), изопропиловый спирт (ИПС) (Panreac), гексан (LiChrosolv), стандарт-титры серной кислоты (ЗАО НПП «Уралхиминвест»), фосфат калия монозамещенный (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), фосфат калия двузамещенный (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), фосфорную кислоту (Fluka), перхлорат лития (Fluka), этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль (ЭДТА) (Fluka), гидроксид калия (Panreac), деионизованную воду с удельным сопротивлением не менее 18 МОм·см. Для проведения твердофазной экстракции применяли картриджи Oasis MAX (3 cc 60 mg) и Oasis HLB (3 cc 60 mg) (Waters).

**Приготовление стандартных растворов.** Стандартный раствор смеси 9 ФХ с концентрацией 50 мкг/мл готовили растворением точных навесок 5 мг каждого из антибиотиков в 100 мл метанола. Для лучшего растворения к раствору добавляли 200 мкл 20%-ного раствора гидроксида калия. Стандартный раствор ломефлоксацина с концентрацией 200 мкг/мл, используемый в качестве внутреннего стандарта, готовили отдельно растворением точной навески 20 мг в 100 мл метанола. Полученные растворы хранили в холодильнике при +4°C.

Рабочие растворы смеси 9 ФХ и ломефлоксацина концентрацией 1,0 и 1,6 мкг/мл соответственно готовили в день проведения исследований разбавлением аликвоты исходного раствора в 10 мМ калий-фосфатном буферном растворе (КФБ) pH 2,5.

**Пробоподготовка.** В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносили навеску гомогенизированной пробы куриных яиц массой 4,0 г. В контрольную пробу массой 4,0 г добавляли рабочий раствор 9 ФХ до концентрации 25 мкг/кг. В подготовленные пробы вносили рабочий раствор внутреннего стандарта ломефлоксацина до концентрации 40 мкг/кг. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и оставляли на 10–15 мин. По истечении времени в исследуемые пробы вносили по 200 мкл 0,1 М раствора ЭДТА, 4 мл метанола, перемешивали в течение 5 мин на шейкере. В каждую пробирку добавляли до 20,0 г (по весу) 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащий 0,1% ЭДТА. Пробы перемешивали на ротаторе в течение 15 мин, центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтровальную бумагу со средним диаметром пор. Аликвоту фильтрата 3,0 мл использовали для проведения ТФЭ-очистки.

Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси антибиотиков фторхинолонового ряда:

1 — марбофлоксацин, 2 — офлоксацин, 3 — пефлоксацин, 4 — норфлоксацин, 5 — цiproфлоксацин, 6 — ломефлоксацин (внутренний стандарт), 7 — энрофлоксацин, 8 — данофлоксацин, 9 — сарафлоксацин, 10 — дифлоксацин, концентрация каждого компонента 25 нг/мл (концентрация ломефлоксацина 40 нг/мл) (ПО «Agilent ChemStation», длина волны возбуждения 285 нм, эмиссии 495 нм)

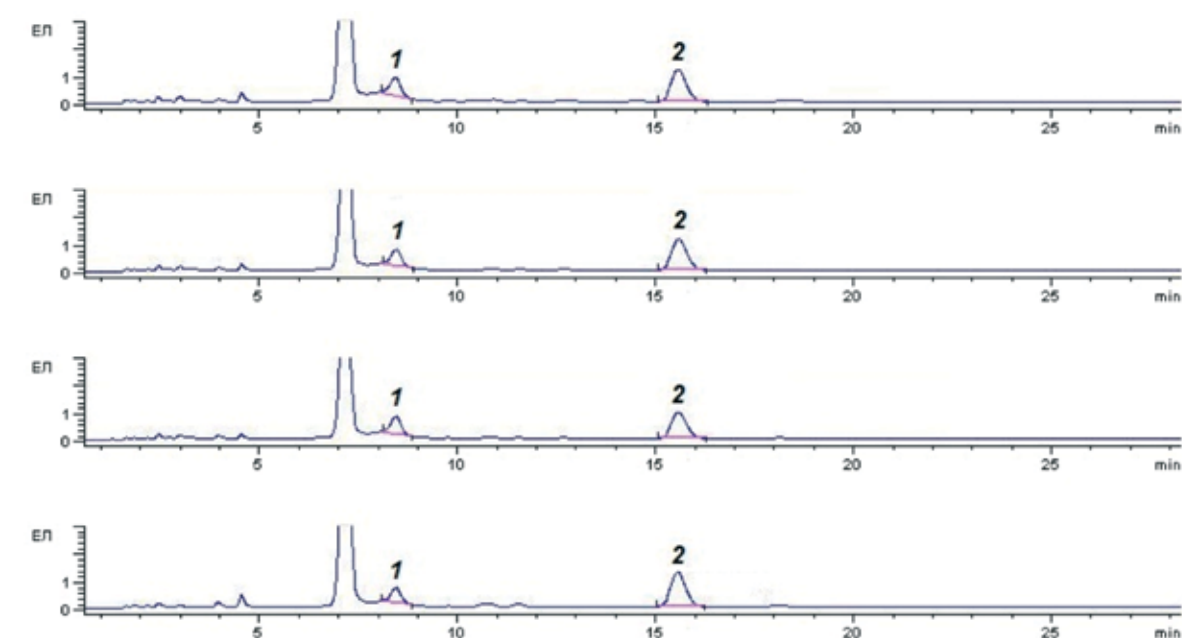
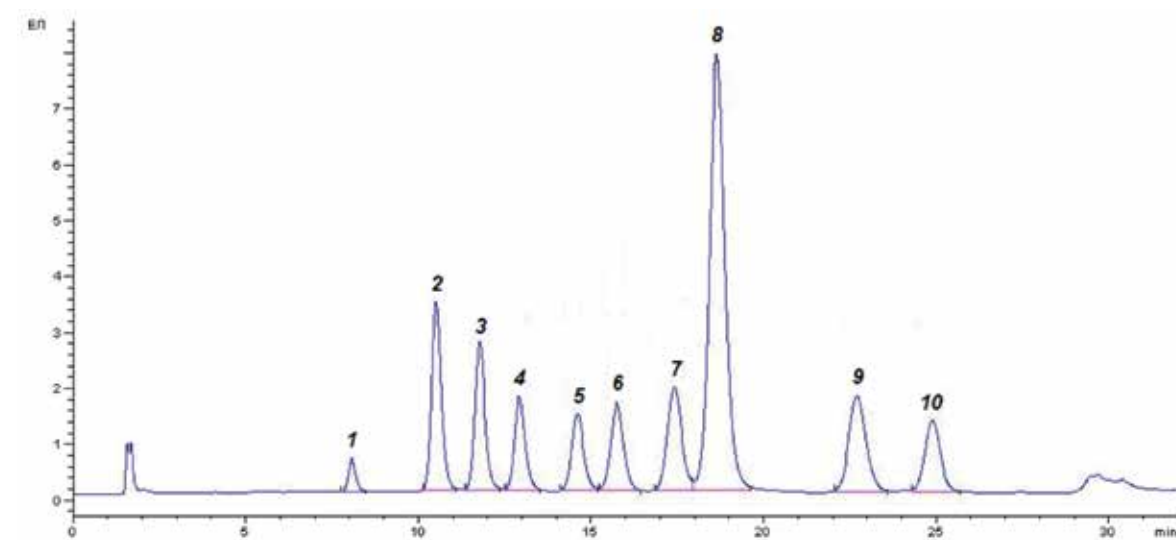


Рис. 3. Хроматограммы экстрактов холостых матричных проб яиц: 1 — компонент матрицы; 2 — ломефлоксацин (внутренний стандарт) (ПО «Agilent ChemStation», длина волны возбуждения 285 нм, эмиссии 495 нм)

**Проведение твердофазной экстракции.** Подготовку картриджа Oasis MAX (3 cc 60 mg) осуществляли последовательным промыванием смесью ТГФ – 1 н серная кислота (1:1) (4×0,5 мл), ТГФ (2×1 мл), деионизованной водой (2×1 мл) и 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащим 0,1% ЭДТА (4×1 мл). Затем вносили 3,0 мл экстракта. Картридж промывали 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащим 0,1% ЭДТА (4×0,5 мл), деионизованной водой (4×0,5 мл), не допуская высыхания сорбента. Элюирование антибиотиков с картриджа в пенциллиновые флаконы проводили смесью ТГФ – 0,06 н серная кислота (1:1) (4×0,5 мл). Перед смывом в каждый флакон добавляли по 1 мл буферного раствора Мак-Иллвейна pH 4,6. Избыток ТГФ удаляли в токе воздуха в течение 20–30 мин при 40°C.

Полученный после первой стадии ТФЭ экстракт концентрировали на картриджах Oasis HLB (3 cc 60 mg). Активацию и кондиционирование сорбента проводили последовательным промыванием смесью ДХМ – ИПС (80:20) (4×0,8 мл), метанолом (2×0,8 мл) и деионизованной водой (3×1 мл). После чего вносили пробу (около 1,5 мл), промывали картридж деионизованной водой (3×1 мл) и гексаном (2×1 мл). Сорбент высушивали в вакууме в течение 3 мин. Антибиотики элюировали смесью ДХМ – ИПС (80:20) (4×0,8 мл). Растворитель удаляли в токе воздуха при 40°C, сухой остаток растворяли в 0,5 мл 10 мМ КФБ pH 2,5. Экстракт центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин и проводили хроматографическое разделение.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Условия хроматографического разделения.** В настоящей работе представлена методика определения 9 антибиотиков хинолонового и фторхинолонового ряда и ломефлоксацина, который использовали в качестве внутреннего стандарта, в яйцах кур. По своей природе антибиотики этого класса имеют сходное строение молекулы и близки по своим физико-химическим свойствам, поэтому подбор условий для их полного хроматографического разделения не является простой за-

дачей. Кроме того, важно не только получить полное разделение анализируемых соединений, но и отделить их от возможных эндогенных компонентов матрицы исследуемой пробы. Способность антибиотиков этой группы к флуоресценции под воздействием возбуждающего излучения дает дополнительное преимущество при разработке методики.

На стандартных смесях ФХ оптимизированы условия их разделения. При использовании хроматографической колонки с обращенной фазой C18 (3×100 мм, 3,5 мкм) с предколонкой (3×20 мм, 3,5 мкм) оптимальной является скорость потока 0,45 мл/мин при температуре термостатирования 20°C. В качестве подвижной фазы А использовали 10 мМ раствор K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 2,5, содержащий 50 мМ перхлората лития и 20 масс.% метанола. Подвижная фаза Б состояла из 80 об.% раствора ацетонитрила. Элюирование проводили 17 мин в изократическом режиме в соотношении подвижной фазы А и Б (96:4) с последующим повышением концентрации фазы Б до 12% к 25 мин. По окончании хроматографического разделения колонку промывали 5 мин при соотношении фаз А и Б (1:1), затем состав подвижной фазы возвращали к первоначальным условиям.

Аналитический сигнал регистрировали с помощью флуориметрического детектора на длине волны возбуждения 285 нм и длине волны эмиссии 495 нм. При длинах волн возбуждения 285 нм и эмиссии 450 нм, которые рекомендуют в научной литературе, интенсивность флуоресцентного сигнала выше, однако при этом уменьшается чувствительность определения марбофлоксацина и офлоксацина. Кроме того, в работе не использованы некоторые антибиотики хинолонового и фторхинолонового ряда, такие как энноксацин, флу-меквин, налидиксовая и оксолиновая кислоты, которые не обладают способностью к флуоресценции. На рис. 2 представлена хроматограмма стандартного раствора смеси ФХ концентрацией 25 нг/мл (концентрация ломефлоксацина 40 нг/мл), полученная в оптимальных условиях.



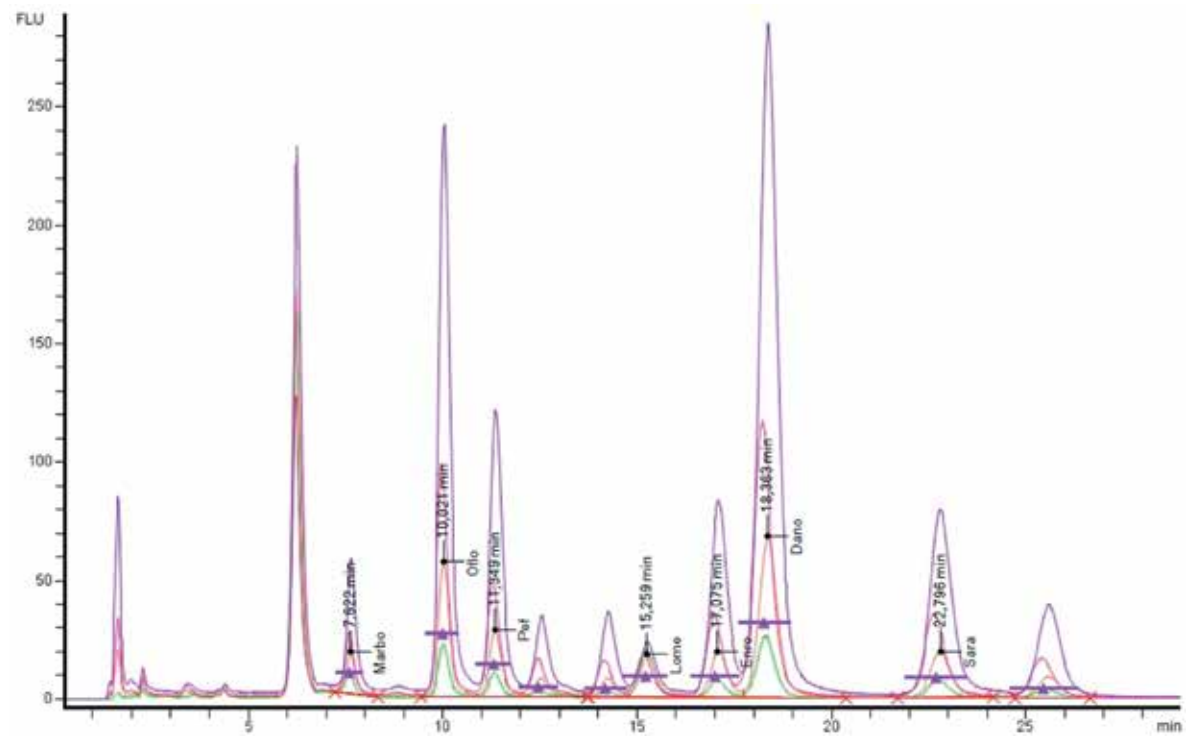


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов холостой матричной пробы яиц с добавками фторхинолонов на уровне 10, 25, 50 и 100 мкг/кг (ПО «Chromera»)

**Влияние матрицы (селективность-специфичность).** Для аналитической методики важна способность «отличать» целевой антибиотик от близкородственных соединений, присутствующих в материале матрицы. Поэтому подходящие образцы холостого материала матрицы исследовали до и после обогащения на целевом уровне в соответствии с методикой. В приложении № 5 к Техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 034/2013 целевым считают содержание антибиотиков фторхинолонового ряда на уровне 0,1 мг/кг (100 мкг/кг). Однако при этом оговаривают, что данный уровень достигается по суммарному содержанию антибиотиков этой группы в материале исследуемой пробы. Поэтому исследования по влиянию эндогенных компонентов матрицы на способность обнаружения антибиотиков фторхинолоновой

группы в пищевой продукции проводили на целевом уровне 25 мкг/кг.

Для проведения таких исследований пробы пищевых продуктов, поступающие в лабораторию химического анализа Испытательного центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», обогащали антибиотиками фторхинолонового ряда на целевом уровне 25 мкг/кг и анализировали в соответствии с разрабатываемой методикой. Результаты исследований яиц кур представлены на рис. 3. Полученные результаты указывают на отсутствие матричного эффекта при исследовании на остаточное содержание фторхинолонов (марбофлоксацин, офлоксацин, пемфлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, ломефлоксацин, энрофлоксацин, данофлоксацин, сарафлоксацин и дифлоксацин) в яйцах кур на целевом уровне 25 мкг/кг.

**Получение основных валидационных характеристик.** Общая схема валидационных исследований методики состояла в проведении 4 серий экспериментов с 4 повторами внутри серии для каждой из 4 концентраций аналитов (10, 25, 50 и 100 мкг/кг). Исследования проводили двое сотрудников, каждый из которых проводил по две серии экспериментов. В качестве валидационных стандартов использовали образцы куриных яиц, которые не содержали антибиотиков фторхинолонового ряда (ниже предела обнаружения методики) по результатам предварительных исследований. Для подтверждения специфичности методики исследовали не менее 20 холостых матричных проб. Из таких проб готовили объединенный валидационный стандарт, который хранили в холодильнике при +4°C на время проведения исследования. В соответствии с описанной выше процедурой подготовки проб, валидационный стандарт обогащали до концентрации ФХ 10, 25, 50 и 100 мкг/кг (рис. 4).

По каждому антибиотику строили объединенные калибровочные кривые, характеристики которых пред-

Таблица 1  
Характеристики калибровочных кривых фторхинолонов

Антибиотик	Уравнение калибровочной кривой	R <sup>2</sup>
Марбофлоксацин	$y = 4,44296E-01x + 2,13171E-01$	0,97453217
Офлоксацин	$y = 2,96125E+00x + 2,09420E-01$	0,99029075
Пемфлоксацин	$y = 1,69062E+00x + 1,26341E-01$	0,98726623
Норфлоксацин	$y = 5,25903E-01x + 1,00201E-01$	0,98402010
Ципрофлоксацин	$y = 5,45804E-01x + 7,60135E-02$	0,97131268
Ломефлоксацин	$y = 1,47528E+04$	0,97681878
Энрофлоксацин	$y = 1,57926E+00x + 1,23286E-01$	0,98528659
Данофлоксацин	$y = 6,16812E+00x + 3,28236E-01$	0,99122949
Сарафлоксацин	$y = 2,14519E+00x + 8,32236E-02$	0,98722683
Дифлоксацин	$y = 1,02848E+00x + 2,48830E-02$	0,98737302

ставлены в табл. 1. Наиболее пригодной функцией для калибровочной кривой оказалась линейная регрессионная модель со взвешиванием 1/x по аргументу «содержание антибиотика в пробе». Для ломефлоксацина, который является внутренним стандартом, калибровочная кривая строилась по одной концентрации 40 мкг/кг, и ее характеристики заданы лишь углом наклона.

Расчеты валидационных характеристик проводили по следующей ниже схеме.

1. Вариация повторяемости внутри серии экспериментов рассчитана по формуле:

$$S_r^2 = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n \frac{(z_{ij} - \bar{z}_i)^2}{p(n-1)} \quad \bar{z}_i = \sum_{j=1}^n \frac{z_{ij}}{n}$$

где  $\bar{z}_i$  — среднее арифметическое значение измерения внутри серии  $i$ ;  
 $z_{ij}$  — единичное значение измерения внутри серии  $i$ .

2. Вариация повторяемости между сериями экспериментов вычислена по формуле:

$$S_b^2 = \left\{ \sum_{i=1}^p \frac{(\bar{z}_i - \bar{z})^2}{p-1} \right\} - \left( \frac{S_r^2}{n} \right); \quad \bar{z} = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n \frac{z_{ij}}{pn}$$

где  $\bar{z}$  — общее среднее значение измерения внутри и между сериями экспериментов.

3. Вариация промежуточной прецизионности оценена по формуле:

$$S_{ip}^2 = S_r^2 + S_b^2$$

4. Неопределенность измерения, связанная со смещением методики, рассчитана по формуле:

$$S_d^2 = \frac{S_{ip}^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) S_r^2}{p}$$

**Расчет неопределенности.** Для того чтобы оценить неопределенность, связанную с результатом измерений, все данные, использованные при построении калибровочных кривых, обрабатывали повторно. При этом валидационные стандарты с добавками считали пробами с неизвестным содержанием антибиотиков. Пересчитанные таким образом величины содержания показывают разброс экспериментальных данных от их фиксированного значения и позволяют оценить суммарную стандартную неопределенность измерений  $u(Y)$  и относительную расширенную неопределенность измерений  $U(Y)$  по формулам:

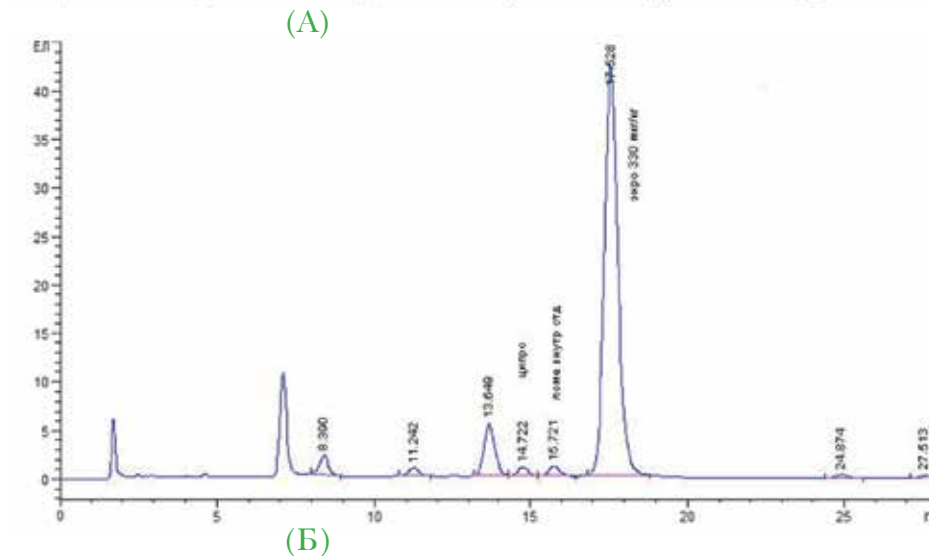
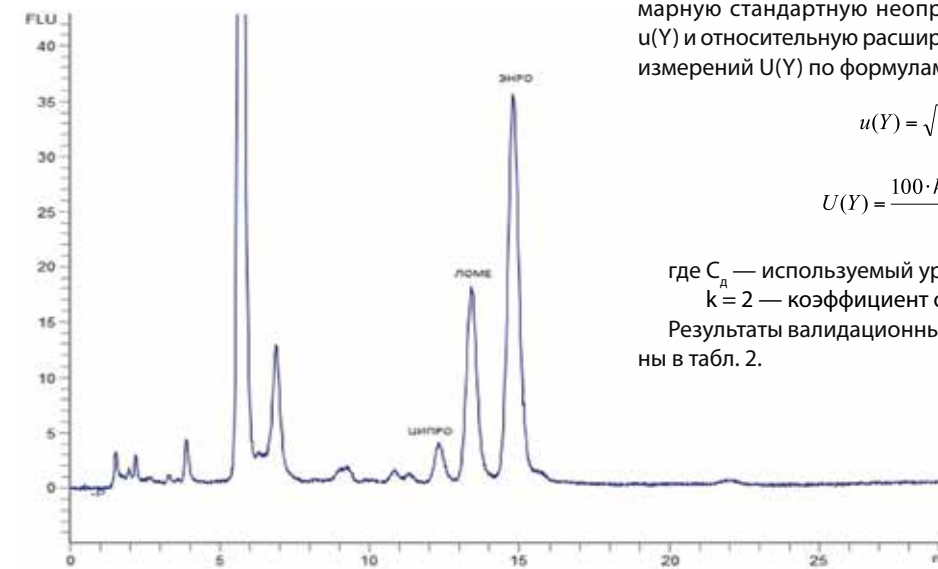
$$u(Y) = \sqrt{S_{ip}^2 + S_d^2};$$

$$U(Y) = \frac{100 \cdot k \cdot \sqrt{S_{ip}^2 + S_d^2}}{C_d}$$

где  $C_d$  — используемый уровень добавки;  
 $k = 2$  — коэффициент охвата.

Результаты валидационных исследований приведены в табл. 2.

Рис. 5. Хроматограммы экстрактов куриных яиц, содержащих энрофлоксацин и ципрофлоксацин в концентрации 40 и 10 мкг/кг (А), 330 и 40 мкг/кг (Б) соответственно (лемефлоксацин является внутренним стандартом) (А — ПО «Agilent ChemStation»; Б — ПО «Chromera»)





**Результаты определения фторхинолонов в куриных яйцах.** При выбранных условиях подготовки проб и хроматографического разделения полученных экстрактов было проанализировано 34 пробы куриных яиц. В 7 пробах были обнаружены определяемые компоненты на уровне от 15 до 60 мкг/кг. В 3 пробах яиц содержание энрофлоксацина составляло 110, 170 и 330 мкг/кг соответственно, что превышает предписанный нормативной документацией уровень 100 мкг/кг. Во всех исследованных положительных пробах обнаружен энрофлоксацин, в 4 из 10 проб ципрофлоксацин и в 1 пробе дифлоксацин. На рис. 5 представлены примеры полученных хроматограмм экстрактов куриных яиц.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, была разработана методика одновременного определения антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. В результате проведенных исследований получены основные валидационные характеристики методики, рассчитана относительная расширенная неопределенность аналитических измерений. По своим валидационным характеристикам методика может быть использована для определения остаточных количеств антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах. По диапазону определяемых содержаний методика позволяет определять следовые количества антибиотиков на уровне допустимых значений 100 мкг/кг в соответствии с Сан-Пин 2.3.2.2804-10 и «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)».

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- ГОСТ Р 51600-2010. Молоко и молочные продукты. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2010. — 19 с.
- ГОСТ Р 53601-2009. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2010. — 12 с.
- ГОСТ Р 53774-2010. Молоко и молочные продукты. Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2010. — 12 с.
- ГОСТ Р 53912-2010. Продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2011. — 6 с.
- ГОСТ Р 54655-2011. Мед натуральный. Метод определения антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2012. — 14 с.
- ГОСТ Р 54904-2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2013. — 16 с.
- МУК 1538-5/23. Методические указания по арбитражному определению остаточного содержания хинолонов в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-

спектрометрическим детектором / ФГУ «ВГНКИ». — М., 2011. — 26 с.

8. МУК 4.2.026-95. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания.

9. МУК 759/5.3. Методические указания по арбитражному определению аминогликозидов в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором / ФГУ «ВГНКИ». — М., 2013. — 25 с.

10. Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis / W. Gao, G. Chen, Y. Chen [et al.] // J. Chromatogr. B. — 2011. — Vol. 879. — P. 291–295.

11. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis / M. Hernandez, C. Aguilar, F. Borrull, M. Calull // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 772. — P. 163–172.

12. Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle q using solid-phase extraction and capillary electrophoresis / D. Barron, E. Jimenez-Lozano, S. Bailac, J. Barbosa // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 767. — P. 313–319.

13. Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk / X. Zhou, D. Xing, D. Zhu [et al.] // Talanta. — 2008. — Vol. 75. — P. 1300–1306.

14. Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sarafloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study / N. Srinivas, L. Narasu, B.P. Shankar, R. Mullangi // Biomed. Chromatogr. — 2008. — Vol. 22. — P. 1288–1295.

15. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters / A.V. Herrera-Herrera, J. Hernandez-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodriguez-Delgado // Electrophoresis. — 2010. — Vol. 31. — P. 3457–3465.

16. Hernandez M., Borrull F., Calull M. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction // J. Chromatogr. B. — 2000. — Vol. 742. — P. 255–265.

17. HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning. Application to urine and serum / A. Espinosa-Mansilla, A.M. de la Pena, D. Gonzalez Gomez, F. Salinas // J. Chromatogr. B. — 2005. — Vol. 822. — P. 185–193.

18. Samanidou V.F., Christodoulou E.A., Papadoyannis I.N. Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and in veterinary drugs by HPLC // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 325–331.

19. Samanidou V.F., Demetriou C.E., Papadoyannis I.N. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 375. — P. 623–629.

20. Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters / M. Sturini, A. Speltini, L. Pretali [et al.] // J. Sep. Sci. — 2009. — Vol. 32. — P. 3020–3028.

**Таблица 2**  
Валидационные характеристики методики определения антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах

Наименование антибиотика	Характеристики методики	Добавленное количество антибиотиков, мкг/кг			
		10	25	50	100
Марбофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	10,45	26,64	51,83	100,86
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	4,01	2,70	5,01	8,21
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	80,1	21,6	20,1	16,4
	Число измерений	16	16	16	16
Офлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,59	25,08	51,35	98,77
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,30	2,03	4,05	7,15
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	46,0	16,2	16,2	14,3
	Число измерений	16	16	16	16
Пефлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,38	24,64	50,56	98,45
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,38	2,70	5,31	9,78
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	47,6	21,6	21,2	19,6
	Число измерений	16	16	16	16
Норфлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	10,39	24,72	51,33	97,88
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,48	2,95	5,68	9,88
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	49,6	23,6	22,7	19,8
	Число измерений	16	16	16	15
Ципрофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,25	24,62	50,11	98,40
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	3,93	4,66	5,21	11,74
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	78,6	37,3	20,8	23,5
	Число измерений	16	16	16	15
Энрофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,28	24,74	50,62	98,60
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,00	3,74	3,73	13,35
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	40,0	30,0	14,9	26,7
	Число измерений 5 месяцев	16	16	16	16
Данофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,54	24,84	50,62	98,38
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	1,93	2,12	3,53	8,03
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	38,6	17,0	14,1	16,1
	Число измерений	16	16	16	16
Сарафлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,81	24,23	51,17	99,44
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,14	2,20	4,44	6,3
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	42,8	16,2	17,8	12,6
	Число измерений	16	16	16	16
Дифлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,99	24,69	50,55	100,0
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	1,04	1,35	4,41	8,93
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	20,8	10,8	17,6	17,9
	Число измерений	16	16	16	16

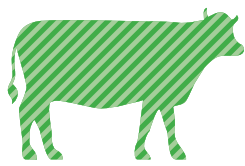
21. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples / S.M. Espoinda, M.E.T. Padron, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodriguez // Anal. Bioanal. Chem. — 2009. — Vol. 394. — P. 927–935.

22. Sowinski K.M., Kays M.B. Determination of ciprofloxacin concentrations in human serum and urine by

HPLC with ultraviolet and fluorescence detection // J. Clin. Pharm. Ther. — 2004. — Vol. 29. — P. 381–387.

23. Turiel E., Bordin G., Rodriguez A.R. Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 257–267.





УДК 619:616.98:578.835.2:616-036.22

## ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЯЩУРУ В МИРЕ В 2013–2015 ГГ. И МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМ

Д.А. Лозовой<sup>1</sup>, А.М. Рахманов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: losovoy@arriah.ru

<sup>2</sup> эксперт, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Представлены официальные данные о напряженной эпизоотической ситуации в 2013–2015 гг. по ящуру животных в мире, в том числе в России, о проводимых в странах противоящурных мероприятиях, об эффективности применения в России вакцин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» из новых штаммов вируса ящура.

Ключевые слова: ящур, эпизоотическая ситуация, новые штаммы, диагностика, вакцины, меры профилактики и борьбы.

UDC 619:616.98:578.835.2:616-036.22

## GLOBAL FMD EPIDEMIC SITUATION IN 2013-2015 AND FMD CONTROL MEASURES

D.A. Lozovoy<sup>1</sup>, A.M. Rakhmanov<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

### SUMMARY

The paper gives official data on stringent foot-and-mouth disease epidemic situation existing in the world including Russia in 2013-2015 and on FMD control measures taken by the countries as well as on efficient use of FGBI «ARRIAH» manufactured FMD vaccines based on emergent FMDV strains.

Key words: FMD, epidemic situation, emergent strains, diagnosis, vaccines, prevention and control measures.

В соответствии с современной международной классификацией ящур включен в список болезней МЭБ в категорию «Болезни, инфекции и инфестации нескольких видов животных» вследствие того, что им могут болеть сельскохозяйственные и дикие животные более 100 видов, принадлежащих к 33 семействам, относящимся к 14 отрядам (КРС, МРС, свиньи, буйволы, верблюды, яки, олени, козули, лоси, кабаны и др.) [2, 5, 12]. Ящур относится к особо опасным трансграничным заболеваниям животных и подлежит обязательной нотификации.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия-1, CAT-1, CAT-2, CAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов вируса. Животные, переболевшие ящуром одного типа, могут повторно заболеть в случае заражения вирусом другого типа.

Источником возбудителя инфекции являются инфицированные и больные животные, а также животные-реконвалесценты, которые длительное время могут быть вирусоносителями. Вирус передается, в основном, алиментарно и аэрогенно. Возбудитель заносится на фермы/хозяйства при поступлении больных или переболевших животных, при контактах с больными (переболевшими) животными, в том числе с дикими, при пастьбе, водопое, перегонах, с инфицированными кормами, водой, а также с молоком при выпайвании телят и поросят, при завозе продуктов убоя больных (переболевших) животных, использовании в корм необезвреженных инфицированных кухонных и других отходов, распространении на значительные расстояния ветром (мелкие частицы кормов, пораженные клеточные элементы тканей, слюны, пыли и т.п.), инфицированными (загрязненными) предметами ухода, одеждой и обувью ухаживающего персонала, транспортными средствами и др.

Ящур может протекать в форме эпизоотий и пандемий с тяжелыми экономическими и социальными последствиями [2, 12, 16]. Анализ данных МЭБ и сообщений СМИ свидетельствует о том, что, несмотря на принимаемые меры, эпизоотическая ситуация по ящуру в мире остается довольно напряженной. По официальным данным, в 2013–2014 гг. неблагополучными по ящуру были 58 стран, из них 30 азиатских и 28 африканских. При этом регистрировали ящур 6 известных типов, в том числе типа О — в 38 странах, А — в 18, Азия-1 — в 5, CAT-1 — в 9, CAT-2 — в 12, CAT-3 — в 1, а в 19 странах тип возбудителя не был установлен [13, 14]. В ряде государств выделяли вирус ящура 2–4-х типов (Афганистан, Китай, Вьетнам, Индия, Ирак, Иран, Монголия, Непал, Палестина, Турция, Бенин, ДР Конго, Египет, Кения, Руанда, Танзания, ЮАР и др.).

С начала 2013 г. и в последующее время в ряде провинций Китая были отмечены вспышки ящура среди КРС и свиней, вызванные вирусом типов О и А. Особую озабоченность вызывал ящур в северо-западном Синьцзян-Уйгурском автономном районе, который граничит с Афганистаном, Индией, Казахстаном, Киргизией, Монголией, Таджикистаном и Россией.

По официальным данным, в мае–июле 2013 г. заболевание КРС ящуром отмечено в Казахстане в двух районах Восточно-Казахстанской области, граничащих с Синьцзян-Уйгурским автономным районом Китая. При лабораторном исследовании проб патологическо-

го материала от животных из этих районов, проведенном в ФГБУ «ВНИИЗЖ», установлен вирус ящура, принадлежащий к генетической линии А/Юго-Восточная Азия-97 (A/SEA-97). Близкородственный изолят вируса ящура типа А был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, доставленных от животных из Монголии.

В марте, а затем в сентябре–октябре 2013 г. в России в 4 пограничных с Китаем районах Забайкальского края отмечено 9 вспышек ящура. При лабораторном исследовании в ФГБУ «ВНИИЗЖ» отобранных в этих районах проб патологического материала от КРС и свиней был выделен вирус ящура типа А. При проведении филогенетического анализа было установлено, что вызвавшее заболевание изоляты вируса относятся к вирусу ящура генетической линии А/SEA-97. По данным Всемирной референтной лаборатории МЭБ по ящуру (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания), выделенные на территории Забайкальского края России, Казахстана и Монголии изоляты на 99% идентичны китайским изолятам А/QHXN-CHA-2013-B и А/GDMM-CHA-2013S.

В июне 2013 г. заболевание ящуром среди КРС отмечено и на Северном Кавказе сначала на отгонном пастбище, а затем в соседнем населенном пункте в Урупском районе Карачаево-Черкесской Республики, граничащей с Грузией. В том же месяце в Краснодарском крае в Мостовском районе, граничащем с Урупским районом, были зарегистрированы 3 неблагополучных пункта. В июле 2013 г. еще один неблагополучный пункт был установлен в Баксанском районе Кабардино-Балкарской Республики, граничащей с Карачаево-Черкесской Республикой. При лабораторном исследовании проб патматериала от животных из этих неблагополучных пунктов, проведенном в ФГБУ «ВНИИЗЖ», был выделен вирус ящура, относящийся к генетической линии А/Иран-05. Изоляты данной генетической линии в 2011–2013 гг. вызывали вспышки ящура на территории стран Ближнего Востока.

Во второй половине 2013 г. неблагоприятная эпизоотическая ситуация по ящуру отмечалась и в Амурской области, граничащей с Китаем. Первый неблагополучный пункт был установлен в июне в Благовещенском районе, в августе еще один в этом же районе и 2 — в соседних Тамбовском и Ивановском районах, в сентябре и в ноябре еще 2 пункта в Тамбовском районе. Выделенные от больных животных в неблагополучных пунктах Амурской области изоляты вируса относятся к генетической линии А/SEA-97 и близкородственные изолятам, выделенным при вспышках ящура на территории Забайкальского края в марте 2013 г. [7, 11, 13].

Следовательно, эпизоотическая ситуация по ящуру в 2013 г. значительно ухудшилась, на территории 5 пограничных субъектов РФ (Забайкальский и Краснодарский края, республики Карачаево-Черкесия, Кабардино-Балкария и Амурская область) официально был зарегистрирован 21 неблагополучный пункт по ящуру типа А. Ящур этого типа на территории России не регистрировали в течение последних 20 лет. Следует подчеркнуть, что выделенные изоляты были детально изучены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [9]. Они отличались в антигенном отношении от штаммов вируса ящура типа А, использованных до того времени для изготовления противоящурных вакцин.

В неблагополучных пунктах заболеваемость КРС колебалась в очень больших пределах (от 0,2 до 84%), что в определенной степени зависело от оперативности





обнаружения первых заболевших животных, постановки диагноза и осуществления противоящурных мероприятий. Заболевание протекало в основном в типичной форме, только в 2 населенных пунктах наблюдали случаи гибели животных. В некоторых пунктах наряду с КРС заболевание отмечали также у свиней и овец [6, 7, 11].

В 2014 г. в Китае отмечено заболевание ящуром КРС и свиней (типа А и О), в Монголии — КРС и МРС (типа А), в Южной Корее — свиней (типа О). Значительное распространение ящур типа О (новый штамм) получил в Северной Корее среди свиней, сопровождавшийся гибелью (24 очага), в Тунисе среди КРС и МРС (150 очагов). В Алжире в период с 27 июля по 31 августа 2014 г. было зарегистрировано 417 очагов ящура типа О, в которых находилось 7085 голов КРС и 1772 головы МРС, из них ящуром заболело 2727 голов КРС (38,5%) и пало 162 (5,9%) животных. У овец признаков ящура не отмечено. Из других стран следует отметить Киргизию, ветеринарная служба которой информировала МЭБ о возникновении в августе 2014 г. ящура среди КРС на пастбище Таласской области, граничащей с Казахстаном, однако серотип вируса при этом не был определен. В африканских странах и на Ближнем Востоке получил распространение ящур типа SAT-2 [14].

В России в первом квартале 2014 г. в Забайкальском крае были отмечены единичные случаи заболевания КРС ящуром типа А и О в двух селах Приаргунского района, граничащего с Китаем, и типа А в одном селе Ононского района, граничащего с Монголией. Изоляты вируса типа А отнесены к генетической группе A/SEA-97, а типа О — к генетической линии O/PanAsia.

В мае 2014 г. ящур типа О получил распространение среди свинополовья в Спасском районе Приморского края, граничащем с Китаем. Сначала массовое заболевание было отмечено на свинокомплексе, где

при эпизоотологическом обследовании обнаружили около 90% больных животных. В последующие две недели ящур был зарегистрирован еще в 6 окружающих селах и свинофермах. Во всех 7 неблагополучных пунктах этого района болели только свиньи, хотя в 3 из них вместе со свиньями находился КРС, у которого клинических признаков ящура не наблюдали [10, 14]. При лабораторном исследовании в ФГБУ «ВНИИЗЖ» по результатам нуклеотидного секвенирования с последующим филогенетическим анализом выделенный из патматериала от больных свиней изолят отнесен к топотипу Юго-Восточная Азия (SEA) вируса ящура типа О. Следует отметить, что Приморский край входит в противоящурную буферную зону РФ, поэтому там до возникновения ящура КРС подвергался профилактической вакцинации против ящура типов А, О, Азия-1. Оперативное применение для вынужденной вакцинации в угрожаемой зоне эмульсионной моновалентной вакцины типа О производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» позволило купировать и ликвидировать ящур в пределах указанного района.

Еще одна вспышка ящура типа А отмечена в сентябре 2014 г. среди КРС в пограничном с КНР селе Приаргунского района Забайкальского края. Выделенный от больных животных изолят вируса ящура, как и в 2013 г., отнесен к генетической линии A/SEA-97.

Возникновение ящура в 2013–2014 гг. только в субъектах Российской Федерации, граничащих с неблагополучными странами, генетическое родство выделенных изолятов со штаммами, циркулирующими в последних, дает основание предполагать занос экзотических вирусов из них различными путями, в том числе с инфицированными продуктами животноводства, кормами и с дикими животными [9, 11].

Почти во все неблагополучные пункты выезжали сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ», которые на местах ока-

зывали помощь в проведении противоэпизоотических мероприятий. Благодаря своевременной диагностике и принятым мерам: наложение карантина, ограничения на передвижения животных и перемещения животноводческой продукции, полный или частичный санитарный убой животных в очагах с выплатой соответствующей компенсации, обязательное проведение кольцевой вакцинации, осуществление дезинфекции помещений и инвентаря, — вспышки, которые вызвали значительный ущерб [1, 10], были локализованы и ликвидированы. Было внесено предложение о необходимости включения в состав противоящурной вакцины новых штаммов возбудителя типа А, обусловивших заболевание ящуром на территории России в 2013 г.

В 2014 г., в соответствии с рекомендациями ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ранее предусмотренными мероприятиями в противоящурной буферной зоне РФ [8], за счет федерального бюджета было осуществлено 14 143,2 тыс. прививок КРС и 22 481,3 тыс. МРС с использованием около 25 384 тыс. доз вакцины производства ФКП «Щелковский биокомбинат» и ФГБУ «ВНИИЗЖ». Было вакцинировано против ящура также 162,5 тыс. свиней эмульсионной вакциной производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», 8,7 тыс. верблюдов и 0,3 тыс. оленей.

Кроме профилактической иммунизации животных против ящура с использованием инактивированной сорбированной трехвалентной А, О, Азия-1 вакцины производства ФКП «Щелковский биокомбинат», в 11 субъектах РФ: в Забайкальском, Хабаровском, Краснодарском и Ставропольском краях, республиках Адыгея, Калмыкия, Северная Осетия, Бурятия, ЕАО, Астраханской и Сахалинской областях, — которые входят в 4 неблагополучных в 2013 г. федеральных округа (Южный, Северо-Кавказский, Сибирский и Дальневосточный), в 2014 г. дополнительно применяли вакцину производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». При ее изготовлении использовали новые производственные штаммы вируса ящура типа А, полученные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из выделенных в 2013 г. эпизоотических изолятов генетической линии A/SEA-97 и генетической линии A/Иран-05 сублинии SIS 10. Эти производственные штаммы депонированы в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» и запатентованы в Российской Федерации. С использованием этой вакцины было осуществлено 1815,4 тыс. прививок КРС и 3285,9 тыс. прививок МРС.

Применение дополнительной вакцины против ящура типа А производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для иммунизации КРС и МРС, как показали результаты обширных серомониторинговых исследований [4], способствовало повышению уровня иммунных животных, что позволило значительно снизить по сравнению с 2013 г. число вспышек ящура типа А в стране и не допустить распространения инфекции в 2014 г.

В I полугодии 2015 г. в противоящурной буферной зоне России с профилактической целью было осуществлено за счет федерального бюджета 4856,6 тыс. прививок КРС и 6782,2 тыс. МРС с применением 8248 тыс. доз инактивированной сорбированной вакцины А, О, Азия-1, рекомендованной ФГБУ «ВНИИЗЖ», в состав которой были включены новые штаммы.

Следовательно, своевременное выявление больных животных, отбор от них проб патматериала и доставка их для исследования, идентификация возбудителя, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление вакцин с использованием новых штаммов и их опера-

тивное применение в неблагополучных зонах позволило купировать и ликвидировать в 2014 г. ящурные очаги, не допустить широкого распространения инфекции. Осуществление этих и других мероприятий, предусмотренных законом РФ «О ветеринарии» (1993 г.), приказом Минсельхоза России от 19.12.2011 г. № 476 и «Инструкцией о мероприятиях по предупреждению и ликвидации заболевания животных ящуром», утвержденной ГУВ МСХ СССР 15.03.1985 г., а также Комплексом совместных мер государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром [3], в значительной мере способствовало тому, что в 2015 г. новых очагов ящура на территории России не регистрировали. В то же время, судя по официальным данным, в ряде зарубежных стран в 2015 г. эпизоотическая ситуация по ящурю была довольно напряженной, особенно в Южной Корее, Китае, Монголии, Турции, Алжире, Бахрейне, Ботсване, Зимбабве, Намибии, ЮАР и др. [15].

В Южной Корее в период с декабря 2014 г. по апрель 2015 г. было зарегистрировано 180 очагов ящура типа О, в которых из 445 233 свиней заболело 141 318 голов (31,7%). Еще в двух очагах отмечены единичные случаи заболевания КРС (из 239 голов заболело 6) (2,5%). В процессе проведения противоящурных мероприятий все больные животные были уничтожены.

В Китае в январе и мае 2015 г. в двух провинциях (Аньхой и Хубэй) отмечалось заболевание ящуром КРС и свиней, обусловленное вирусом генетической группы A/SEA-97. В Монголии вспышки ящура типа О имели место в феврале–мае и октябре 2015 г. в трех аймаках, граничащих с Китаем: в юго-западных Кобдоском и Баян-Улэгэйском аймаках, граничащих с Синьцзян-Уйгурским автономным районом Китая, где болели КРС, МРС и верблюды, и в юго-восточном Сухэ-Баторском аймаке, граничащем с автономным районом Китая — Внутренняя Монголия, где болел КРС. Результаты проведенных лабораторных исследований (ПЦР, секвенирование и филогенетический анализ) патматериала от больного КРС, поступившего в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из Баян-Улэгэйского аймака, показали, что вспышка ящура там была обусловлена вирусом ящура генетической линии O/ME-SA/PanAsia.

В Турции в сентябре–октябре 2015 г. в трех илах (вилаятах): Ван, Битлис и Амасья — среди КРС были зарегистрированы вспышки ящура типа А. При этом в иле Амасья из 2123 голов заболело 417 животных (19,6%), пало 34 (8,2%). Возникновение ящура связывают с нелегальными перемещениями животных, контактами с зараженными животными при водопое и на пастбищах, переносом вируса транспортными средствами, кормами и др. При детальном изучении выделенного возбудителя вспышек в Турецком ящурном институте, который является национальной лабораторией по ящурю, и во Всемирной референтной лаборатории МЭБ по ящурю (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания) он был определен как новый штамм «генотип G-VII» [15]. В последующем этот штамм быстро распространился на значительной территории страны, и болезнь перешла в категорию эндемических. В сентябре–октябре 2015 г. в двух провинциях Саудовской Аравии также отмечался ящур, обусловленный вышеупомянутым штаммом (заболело 595 голов КРС и 90 — овец).

В ноябре 2015 г. в Израиле в одном хозяйстве была зарегистрирована вспышка ящура типа О в группе свиноматок с поросятами. Из 2300 животных заболело 172 (7,5%), из них пало 120 (69,8%), в основном поросят

с характерными изменениями сердечной мышцы («тигроидностью»). Затем в соседнем хозяйстве отмечали заболевание ящуром среди мясного скота, выращиваемого на открытом выгуле.

В Алжире в марте–апреле 2015 г. вследствие нелегального завоза животных возникло 12 очагов ящура типа О, в которых болели овцы и КРС. Широкое распространение ящур типа САТ-2 среди КРС разного возраста (вначале был типирован как САТ-1) получил в другом африканском государстве — Зимбабве вследствие контактов с дикими животными — резервуаром возбудителя болезни, несанкционированных перемещений животных из неблагополучных районов, завоза с рынков, при использовании общих пастбищ и водоемов. В январе–сентябре 2015 г. на территории этой страны было зарегистрировано 126 очагов, в которых из 164 726 животных заболело 5977 голов (3,6%). Невысокий процент заболевших ящуром животных в этой стране следует объяснить осуществлением профилактической вакцинации животных. Однако из-за недостаточного количества вакцины иммунизация животных не является поголовной, обеспеченность вакциной официально составляет 78%.

В Намибии в мае–июле 2015 г. было установлено 29 очагов заболевания ящуром среди КРС, при этом вначале возбудитель был определен как вирус типа САТ-2, а затем как САТ-1. По официальным данным, из 25 393 голов КРС, находившихся в очагах, заболело всего 364 животных (1,4%). Невысокая заболеваемость связана, вероятно, с осуществлением в стране профилактической вакцинации животных против ящура.

В большинстве зарубежных стран перечень осуществляемых противоящурных мероприятий включает полный или частичный санитарный убой животных, карантин, ограничения на перемещения животных и животноводческой продукции, скрининг, зонирование, дезинфекцию инфицированных помещений и инвентаря. В связи с возникновением ящура во многих государствах проводят вынужденную вакцинацию животных, даже несмотря на то, что до возникновения ящура действовал запрет на нее, как, например, в ЮАР. В официальных сообщениях в МЭБ руководители ветеринарных служб различных стран иногда указывают на применение симптоматического лечения больных животных, а чаще подчеркивают, что обходились без лечения зараженных животных. Во многих государствах в настоящее время большое внимание уделяется разработке и реализации планов поэтапной борьбы с ящуром с целью улучшения или сохранения официального статуса страны в соответствии с Глобальной стратегией борьбы с ящуром МЭБ/ФАО [16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по ящур в мире в 2013–2015 гг. характеризовалась определенной напряженностью. Возникновение ящура в 2013–2014 гг. в субъектах Российской Федерации, граничащих с неблагополучными странами, генетическое родство выделенных изолятов со штаммами, в них циркулирующими, дает основание предполагать занос из этих стран экзотических вирусов. Своевременная диагностика вспышек ящура, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление вакцин с использованием новых штаммов и их оперативное применение в неблагополучных зонах позволило купировать и ликвидировать ящурные очаги. С целью недопуще-

ния заноса, возникновения и распространения ящура в России необходимо добиваться своевременного и полного осуществления общих и специальных ветеринарно-санитарных мер по обеспечению благополучия страны по ящур, в том числе своевременного и поголовного охвата животных профилактической вакцинацией в соответствии с рекомендуемыми схемами и применением вакцин, приготовленных с использованием актуальных штаммов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуленкин В.М. Ящур в Азиатско-Тихоокеанском регионе и его экономические последствия // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 4–8.
2. Инфекционная патология животных. Руководство в 7 т. Т. 1. Ящур / ред. А.Я. Самуйленко. — М.: ВНИТИБП, 2014. — 264 с.
3. Комплекс совместных мер государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром на период до 2020 г.: утв. решением Совета глав правительств СНГ 30.05.2014 г. — Минск, 2014. — 19 с.
4. Кременчугская С.Р., Луговская Н.Н., Фомина С.Н. Оценка эффективности противоящурной вакцинации животных в буферной зоне Российской Федерации в 2014 году // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир. — 2015. — Т. 13. — С. 20–28.
5. Критерии включения болезней, инфекций и инфестаций в список МЭБ // Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЭБ. — 24-е изд. — Paris, France, 2015. — С. 4–7.
6. Мищенко А.В., Кременчугская С.Р., Рахманов А.М. Обострение эпизоотической ситуации по ящуром животных в Азии и России // Инновационные процессы в АПК: сб. статей 6-й Международной научно-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов РУДН. — М., 2014. — С. 168–171.
7. Рахманов А.М., Мищенко А.В., Фомина С.Н. Эпизоотическая ситуация по ящуром животных на Северном Кавказе // Вестник ветеринарии. — 2014. — Т. 69, № 2. — С. 11–14.
8. Шеин С.А. Вопросы угрозы распространения болезней животных и птиц на территории Российской Федерации // Farm Animals. — 2013. — № 3–4. — С. 28–36.
9. Щербakov А.В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура) // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3 (14). — С. 30–36.
10. Экономические последствия от ящура в Приморском крае в 2014 году / В.М. Гуленкин, А.К. Караулов, А.В. Мищенко [и др.] // Ветеринарный врач. — 2015. — № 4. — С. 9–12.
11. Эпизоотологические особенности ящура типа А, вызванные гетерологичными штаммами вируса / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, В.В. Дрыгин [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 11. — С. 20–24.
12. Ящур / А.Н. Бурдов, А.И. Дудников, П.В. Малярец [и др.]; под ред. А.Н. Бурдова. — М.: Агропромиздат, 1990. — 320 с.
13. OIE. Disease Information. — 2013. — Vol. 26. — № 1–52.
14. OIE. Disease Information. — 2014. — Vol. 27. — № 1–52.
15. OIE. Disease Information. — 2015. — Vol. 28. — № 1–53.
16. The Global Foot and Mouth Disease Control Strategy / OIE/FAO. — Paris, 2012. — 44 p.

УДК 619:61698:578:616-078

## ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГ В РЕАКЦИИ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ

С.В. Кононова<sup>1</sup>, О.П. Бьядовская<sup>2</sup>, А.А. Нестеров<sup>3</sup>, И.Н. Шумилова<sup>4</sup>, А.В. Кононов<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

<sup>3</sup> ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nesterov@arriah.ru

<sup>4</sup> ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>5</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по использованию реакции микронеutralизации для выявления специфических антител к вирусу болезни Шмалленберг. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью и пригоден для анализа сывороток крови различных видов животных.

Ключевые слова: вирус болезни Шмалленберг, культура клеток, инфекционная активность, реакция микронеutralизации.

UDC 619:61698:578:616-078

## DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO SCHMALLEMBERG VIRUS USING MICRONEUTRALISATION TEST

S.V. Kononova<sup>1</sup>, O.P. Byadovskaya<sup>2</sup>, A.A. Nesterov<sup>3</sup>, I.N. Shumilova<sup>4</sup>, A.V. Kononov<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH» Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nesterov@arriah.ru

<sup>4</sup> Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir

<sup>5</sup> Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

### SUMMARY

The article presents data on microneutralization test for detection of specific antibodies to Schmallenberg virus. The method is characterized by high sensitivity and specificity. It can be used for analysis of blood sera of different species of animals.

Key words: Schmallenberg virus, cell culture, infectivity, microneutralization test.

### ВВЕДЕНИЕ

Заболевание жвачных животных, вызванное вирусом болезни Шмалленберг (БШ), было впервые зарегистрировано в странах Европы летом 2011 г. Новый вирус относится к семейству *Bunyaviridae* и имеет высокую степень гомологии с геномами вирусов, входящих в серогруппу *Simbu*, являющихся представителями рода *Orthobunyavirus* [2].

Установлена патогенность вируса БШ для овец, коз и крупного рогатого скота (КРС). Вирус был выявлен также у диких и находящихся в неволе альпак, зубров (бизонов), косулей, благородных оленей, ланей, муфлон и даже собак [4].

Основными путями распространения вируса БШ являются: трансмиссивный, трансплацентарный и через сперму инфицированных животных [7]. Потенциальными переносчиками являются мокрецы рода *Culicoides* [5].

По данным МЭБ, клинические признаки БШ регистрировались в 9 странах: Бельгии, Великобритании, Германии, Испании, Италии, Люксембурге, Нидерландах, Франции, Швейцарии [8].

При проведении мониторинговых исследований проб сывороток крови на наличие антител к вирусу БШ были выявлены серопозитивные животные в ряде регионов Российской Федерации (РФ), в частности в Республике Татарстан, Красноярском крае, Белгородской, Брянской, Владимирской, Калининградской, Нижегородской, Костромской, Псковской, Курской, Московской, Тверской, Тульской и Ярославской областях.

В настоящий момент меры борьбы с БШ сводятся к мониторингу среди восприимчивых животных, изменению условий их содержания и карантину заболевших животных. В период активности насекомых-переносчиков необходимо обеспечить защиту животных от их укусов.



**Таблица 1**  
Результаты исследования сывороток крови животных методами ИФА и РМН

Характеристика сыворотки	Наличие антител к вирусу БШ				
	Н-ИФА (IDVET)*		РМН**		
	% позитивности	результат	титр	результат	
Сыворотка, содержащая антитела к вирусу БШ	КРС	195	пол.	1:16	пол.
		173	пол.	1:16	пол.
		119	пол.	1:8	пол.
		250	пол.	1:16	пол.
		185	пол.	1:16	пол.
		128	пол.	1:8	пол.
		138	пол.	1:8	пол.
		141	пол.	1:8	пол.
		169	пол.	1:8	пол.
		154	пол.	1:8	пол.
	МРС	114	пол.	1:8	пол.
		188	пол.	1:16	пол.
		158	пол.	1:8	пол.
		162	пол.	1:8	пол.
		149	пол.	1:8	пол.
		95	пол.	1:4	пол.
		80	пол.	1:4	пол.
	европейский муфлон	117	пол.	1:8	пол.
		193	пол.	1:16	пол.
		201	пол.	1:32	пол.
европейская лань	213	пол.	1:32	пол.	
	221	пол.	1:64	пол.	
благородный олень	151	пол.	1:8	пол.	
	160	пол.	1:8	пол.	
Нормальная сыворотка	КРС	85	пол.	1:4	пол.
		139	пол.	1:8	пол.
	0	отр.	1:2	отр.	
	0	отр.	<1:2	отр.	
	0	отр.	<1:2	отр.	
Референтная отр. сыворотка (IDVET)	МРС	0	отр.	<1:2	отр.
		0	отр.	<1:2	отр.
Референтная пол. сыворотка (IDVET)		100	пол.	1:128	пол.
Сыворотка, специфичная к вирусу:	ВД КРС	0	отр.	<1:2	отр.
	ИРТ КРС	0	отр.	<1:2	отр.
	ПГ-3 КРС	0	отр.	<1:2	отр.

\* результат в Н-ИФА (IDVET) в разведении 1:10 по % (s/p) ≤50% — отрицательный, >60% — положительный;  
\*\* титр в РМН ≤2 — отрицательный, ≥4 — положительный результат; пол. — положительный; отр. — отрицательный.

Диагностика заболевания осуществляется серологическими методами (разработаны коммерческие наборы иммуноферментного анализа (ИФА)) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Учеными института им. Ф. Лёффлера (Германия) разработана и валидирована ПЦР-тест-система для выявления вируса в образцах крови и патологическом материале, используемая в научно-исследовательских институтах стран Европейского союза. Однако для выявления специфических антител к вирусу БШ рекомендуемым методом является реакция нейтрализации [8].

Цель настоящей работы состояла в изучении возможности использования реакции микронейтрали-

## БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

ции (РМН) для выявления вируснейтрализующих антител к вирусу БШ в сыворотках крови различных видов животных.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирус.** В опытах использовали вирус БШ (изолят ВН80/11-4, регистрационный номер RVB-1099, полученный из института им. Ф. Лёффлера, Германия). Вирусный материал был адаптирован к культурам клеток (КК) ВНК-21/13 (перевиваемая линия КК почки сирийского хомяка, Beby hamster kidney cell), Vero (перевиваемая линия КК почки африканской зеленой мартишки, *Cercopithecus aethiops*), ПС (перевиваемая линия КК почки сайги, *Saiga tatarica* L.). Активность вируса в данных КК составляла 4,0–4,5 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> [1].

Вирус БШ титровали микрометодом в стерильных 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах общепринятым методом. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

На основании результатов предварительного титрования готовили рабочие разведения вируса БШ в пределах 200 ТЦД<sub>50</sub>/0,05 см<sup>3</sup>.

**Сыворотки.** В качестве положительного и отрицательного контроля использовали референтные сыворотки крови (IDVET, Франция). Материалом для исследования служили сыворотки крови жвачных животных, полученные из различных хозяйств РФ, неблагополучных по данной патологии. Контрольные и исследуемые сыворотки инактивировали 30 мин на водяной бане при 56°C и в необходимом объеме использовали для постановки РМН.

Постановку РМН проводили согласно «Методическим рекомендациям по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в реакции нейтрализации микрометодом» [6]. Для этого готовили 2-кратные разведения исследуемых сывороток в объеме 0,05 см<sup>3</sup> на питательной среде Игла. Далее во все лунки планшета вносили по 0,05 см<sup>3</sup> рабочего разведения вируса (200 ТЦД<sub>50</sub>/0,05 см<sup>3</sup>). Планшеты инкубировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C в течение 1 ч. После чего во все лунки планшета вносили суспензию КК Vero или ВНК-21/13 с концентрацией клеток 0,4–0,6×10<sup>6</sup> кл/см<sup>3</sup> и помещали в СО<sub>2</sub>-инкубатор при температуре 37°C на 48–96 ч. Наблюдения проводили с использованием инвертируемого микроскопа, регистрируя лунки с выраженным ЦПД вируса и/или с цельным неповрежденным монослоем.

При исследовании полевых сывороток отрицательными считали пробы в разведении 1:2, положительными — начиная с разведения 1:4 и выше.

С целью оценки специфичности и чувствительности разработанного метода проводили сравнение результатов РМН с результатами ИФА коммерческого набора для выявления антител к вирусу БШ в сыворотках крови жвачных животных (ID Screen Schmallenberg virus Competition Multi-species фирмы IDVET, Франция). Относительную чувствительность и специфичность метода РМН вычисляли по стандартной формуле [3]. Полученные результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 6,0: Basic Statistics and Tables.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью РМН было проведено исследование 536 проб сывороток крови животных, полученных из различных субъектов РФ (Калининградской, Псковской, Владимирской, Нижегородской областей,

## БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

Республики Татарстан). Результаты частично представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что разработанный способ постановки РМН позволяет выявлять антитела к вирусу БШ в сыворотках крови различных видов жвачных животных, при этом результаты, полученные с помощью РМН, сопоставимы с результатами коммерческого теста ИФА.

Для подтверждения специфичности РМН были использованы гетерологичные сыворотки крови КРС, имеющие антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС, вирусной диареи (ВД) КРС, парагриппа-3 (ПГ-3) КРС, полученные после иммунизации животных вакцинами эмульсионными инактивированными производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (табл. 1). Было показано, что реакция с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

Для определения относительной чувствительности и специфичности метода проводили сравнение результатов РМН с результатами коммерческого набора ИФА. Результаты исследования сывороток крови животных с помощью двух тест-систем представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, с помощью двух тест-систем исследовали 132 пробы сывороток крови от КРС и МРС. Специфичность РМН относительно ИФА составила 88,6%, а относительная чувствительность — 85,2%.

Кроме того, проведенное исследование 132 проб сывороток с различным уровнем антител к вирусу БШ использовали для установления корреляционной зависимости между РМН и ИФА. Результаты частично представлены в табл. 3 и на рисунке.

Результаты двух тестов подвергали регрессионному анализу. Коэффициент корреляции (r) между результатами РМН и ИФА при 95% вероятности составил 0,889.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ свидетельствовал о том, что разработанная РМН может применяться как альтернативная методу ИФА для выявления антител против изучаемой инфекции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было показано, что разработанная реакция микронейтрализации позволяет выявлять вирусспецифические антитела против вируса болезни Шмалленберг в сыворотках крови различных видов жвачных животных.

Метод продемонстрировал высокую специфичность (88,6%), чувствительность (85,2%) и корреляцию относительно ИФА (r=0,889) и может быть использован в рамках проведения мониторинговых исследований по оценке степени распространения данной инфекции у восприимчивых животных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптация вируса болезни Шмалленберг к перевиваемым клеточным культурам / С.В. Кононова, А.А. Нестеров, В.В. Думова [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 2 (13). — С. 17–21.
2. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина / А.В. Спрыгин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, В.А. Мищенко // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 6. — С. 24–34.
3. Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики. — Владимир: Демиург, 2004. — 460 с.
4. Князев В.П. Болезнь Шмалленберг. — Владимир, 2015. — 55 с.

**Таблица 2**  
Оценка относительной чувствительности и относительной специфичности РМН

ИФА	РМН		
	Положительные сыворотки	Отрицательные сыворотки	Всего
Положительные сыворотки	75	13	88
Отрицательные сыворотки	5	39	44
Всего	80	52	132

**Таблица 3**  
Данные для построения графика линейной зависимости Lg T (РМН) от Lg S/P (ИФА)

№ п/п	РМН		ИФА	
	Титр	Lg T	S/P	Lg S/P
1	1:4	0,60205991	0,90	-0,045757491
2	1:4	0,60205991	0,74	-0,15490196
3	1:4	0,60205991	0,76	-0,119186408
4	1:4	0,60205991	0,79	-0,102372909
5	1:4	0,60205991	0,84	-0,075720714
6	1:8	0,903089987	1,28	0,10720997
7	1:8	0,903089987	1,38	0,139879086
8	1:8	0,903089987	1,67	0,222716471
9	1:8	0,903089987	1,41	0,149219113
10	1:8	0,903089987	1,69	0,227886705
11	1:16	1,204119983	2,13	0,328379603
12	1:16	1,204119983	2,47	0,392696953
13	1:16	1,204119983	1,84	0,264817823
14	1:16	1,204119983	1,91	0,281033367
15	1:16	1,204119983	1,20	0,294466226

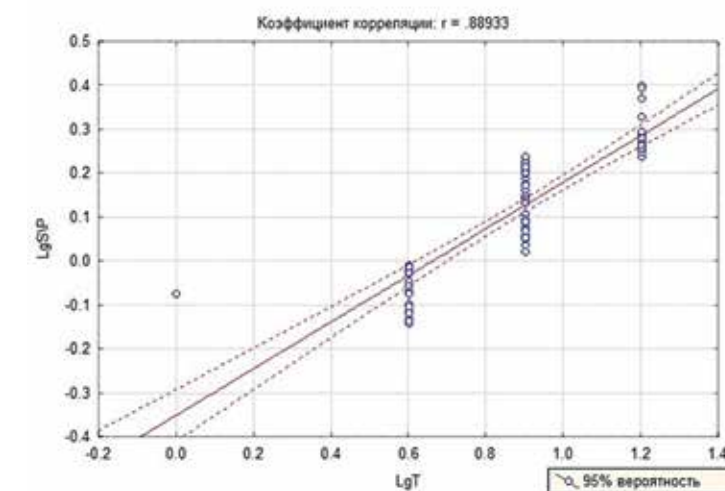


Рис. График линейной зависимости Lg T (РМН) от Lg S/P (ИФА)

5. Кухаркина О.В., Борисова О.А. Болезнь Шмалленберга: обзор литературы. — Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2014. — 70 с.
6. Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в реакции нейтрализации микрометодом / С.В. Кононова, В.В. Думова, А.А. Нестеров [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 24 с.
7. Gibbens N. Schmallenberg virus: a novel viral disease in northern Europe // Vet. Rec. — 2012. — Vol. 170, № 2. — P. 58.
8. Schmallenberg virus // OIE. Technical Factsheet. — 2012. — URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/A\\_Schmallenberg\\_virus.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf).

# ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ ХОЗЯЙСТВ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

**Г.Л. Багиян**

Первый заместитель министра, кандидат ветеринарных наук, Министерство сельского хозяйства Республики Армения, e-mail: dizak.minagro@mail.ru

## РЕЗЮМЕ

Проведен анализ результативности оздоровительных мероприятий неблагополучных по бруцеллезу общин, по результатам которого предлагается проводить серологические исследования всего зрелого поголовья в них с перерывом в 30 дней, а выявленных больных животных в течение 10–15 дней подвергать убою. Также необходимо проводить систематические дезинфекции во дворах и скотоводческих помещениях неблагополучных хозяйств.

Исходя из требований Евразийского экономического союза, считаем целесообразным издать в Республике Армения новый указ по борьбе с бруцеллезом. Все мероприятия, предназначенные для борьбы против бруцеллеза, должны соответствовать методам ведения животноводства в Республике Армения.

Ключевые слова: бруцеллез, неблагополучные общины, серологическая реакция, крупный рогатый скот, зараженность.

# ASSESSING EFFECTIVENESS OF CORRECTIVE MEASURES TAKEN ON BRUCELLOSIS-AFFECTED FARMS IN MODERN ARMENIA

**G.L. Bagyan**

First Deputy Minister, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Ministry of Agriculture of the Republic of Armenia, e-mail: dizak.minagro@mail.ru

## SUMMARY

Effectiveness of the corrective measures taken in the communities affected by brucellosis was analyzed. Based on the results obtained, it is suggested that the whole mature population should be serologically tested with a 30-day interval and the detected diseased animals should be killed within 10–15 days. In addition, backyards and animal facilities on the affected farms should be systematically disinfected.

Pursuant to the requirements of the Eurasian Economic Union it is reasonable to issue a new order on brucellosis control in the Republic of Armenia. All the measures designed to control brucellosis shall comply with the livestock practices implemented in the Republic of Armenia.

Key words: brucellosis, affected communities, serological response, cattle, infection rate.

## ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез в Республике Армения был диагностирован давно, и на данный момент заболевание имеет широкое распространение. В целях выявления неблагополучных хозяйств два раза в год в рамках национальной программы проводятся серологические исследования крови половозрелого крупного рогатого скота. Выявленное поголовье подвергается принудительному убою. В советское время подобные хозяйства официально объявлялись неблагополучными, а оздоровление осуществлялось согласно требованиям инструкции: с перерывами в каждые 30 дней проводились серологические исследования сыворотки крови животных стада и обязательная дезинфекция мест содержания. Больных животных своевременно отделяли от стада и подвергали убою, однако не в дворовых условиях, а на мясокомбинатах. Вместе с указанными мерами применялась также активная иммунизация здорового поголовья при помощи соответствующих вакцин. Данные мероприятия после приватизации животноводства (1990 г.) по сей день, исходя из объективных и субъективных условий, осуществляются частично, поэтому бруцеллез в неблагополучных хозяйствах долгие годы носит стационарный характер [1–5].

Целью работы является проведение исследований в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах для оценки результативности осуществляемых в современных условиях оздоровительных мероприятий, которая, в свою очередь, послужит основой для разработки новых, научно обоснованных схем, необходимых для борьбы с бруцеллезом в Республике Армения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работы проводились в неблагополучных по бруцеллезу общинах: Цгук Сюникской области, Арташен Ширакской области, Кош Арагацотнской области, Канакераван Котайкской области, — в каждой из которых регистрировались результаты очередных серологических исследований, сроки проверок, продолжительность перерывов, вовлеченное поголовье, интенсивность заражения. В указанных общинах пробы крови у поголовья крупного рогатого скота старше двух лет были взяты местными ветеринарами. В двух экземплярах был составлен список крови, в котором отмечались имя и фамилия владельцев, клички животных и сроки, в которые пробы были представлены в центральную районную ветеринарную лабораторию. Исследования проводились с применением реакции агглютинации с Роз-Бенгал антигеном (Роз-Бенгал тест, или РБТ). Пробы крови положительно отреагировавших животных были отправлены в национальную ветеринарную лабораторию для повторного анализа в реакции агглютинации (РА) и РБТ, а результаты исследований — в центр ветеринарного обслуживания данного района. В общине Арташен исследовалось соотношение зараженного бруцеллезом поголовья скота с существующими отдельными частными хозяйствами. На основе имеющихся записей местных специалистов были собраны данные, позволяющие уяснить наличие или отсутствие в прошлые годы случаев бруцеллеза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований по отдельным общинам представлены в табл. 1–4.

Таблица 1

Динамика оздоровления крупного рогатого скота в неблагополучной по бруцеллезу общине Цгук

Сроки анализа образцов крови	Перерывы в исследовании	Кол-во исследованных проб (РБТ)	Кол-во положительных проб	Зараженность, %	Возрастные группы
2005 г.	6 месяцев	1219	22	1,8	старше 2 лет
2006 г.	6 месяцев	1408	16	1,1	старше 2 лет
2007 г.	6 месяцев	1200	37	3,1	старше 2 лет
2008 г.	6 месяцев	1409	63	4,5	старше 2 лет
2009 г. январь	6 месяцев	709	101	14,2	коровы, нетели
2009 г. февраль	30 дней	564	28	5,0	коровы, нетели
2009 г. март	30 дней	472	12	2,6	коровы, нетели
2009 г. май	45 дней	513	23	4,5	коровы, нетели
2009 г. июнь	30 дней	382	18	4,7	коровы, нетели
2009 г. август	25 дней	350	4	1,14	коровы, нетели
2009 г. август	17 дней	356	5	1,4	коровы, нетели
2009 г. октябрь	55 дней	451	14	3,1	коровы, нетели
2009 г. декабрь	56 дней	298	2	0,67	коровы, нетели
2010 г. май	5 месяцев	298	9	3,0	коровы, нетели
2010 г. июнь	60 дней	282	5	1,8	коровы, нетели
2010 г. сентябрь	60 дней	390	0	0	коровы, нетели
2010 г. октябрь	90 дней	332	0	0	коровы, нетели



**Таблица 2**  
Динамика оздоровления крупного рогатого скота в неблагополучной по бруцеллезу общине Арташен

Сроки анализа образцов крови	Перерывы в исследовании	Кол-во исследованных проб (РБТ)	Кол-во положительных проб	Зараженность, %	Возрастные группы
2007 г. май	6 месяцев	636	11	1,73	старше 2 лет
2007 г. декабрь	7 месяцев	269	9	3,35	коровы, телки
2008 г. ноябрь	11 месяцев	603	54	8,96	старше 2 лет
2009 г. февраль	60 дней	672	142	21,1	старше 2 лет
2009 г. март	30 дней	442	50	11,3	коровы, нетели
2009 г. апрель	30 дней	412	14	3,4	коровы, нетели
2009 г. июнь	60 дней	412	6	1,46	коровы, нетели
2010 г. май	10 месяцев	221	6	2,7	коровы, нетели
2010 г. июнь	30 дней	228	0	0	коровы, нетели
2010 г. ноябрь	5 месяцев	321	0	0	коровы, нетели

Бруцеллез крупного рогатого скота в общине Цгук был зарегистрирован еще в 1982 г., во время серологических исследований с перерывами в каждые 6 месяцев были обнаружены 2–3 головы положительно реагирующих коров.

Результаты проведенных с 2005 по 2008 гг. проверок с перерывами в каждые шесть месяцев, представленные в табл. 1, показывают, что количество больных бруцеллезом в общине Цгук колебалось в пределах 16–63 головы, а зараженность достигала 4,5%.

Согласно проведенному в январе 2009 г. серологическому анализу сыворотки крови среди 709 голов не-

телей и коров, в реакции РБТ положительной была 101 проба (14,2%). Эти пробы повторно исследовали при помощи РА, подтвердив данные РБТ.

Были зарегистрированы случаи выкидышей у имеющих 5–7-месячную беременность 8 нетелей и 4 коров. С января 2009 г. община Цгук была объявлена неблагополучной. Очередные проверки поголовья крупного рогатого скота в общине по требованиям Минсельхоза РА были проведены с перерывами в 1–1,5 месяца. Уже в декабре количество больных сократилось до 2 голов. Однако во время последующей проверки, проведенной с перерывом в 5 месяцев, количество больных

**Таблица 3**  
Динамика оздоровления крупного рогатого скота в неблагополучной по бруцеллезу общине Кош

Сроки анализа образцов крови	Перерывы в исследовании	Кол-во исследованных проб (РБТ)	Кол-во положительных проб	Зараженность, %	Возрастные группы
2002 г.	6 месяцев	2091	3	0,14	старше 1 года
2003 г.	6 месяцев	3670	4	0,11	старше 1 года
2004 г.	6 месяцев	3435	2	0,06	старше 1 года
2005 г.	6 месяцев	1522	2	0,13	коровы, нетели
2006 г. март	5 месяцев	754	3	0,4	коровы, нетели
2006 г. ноябрь	8 месяцев	450	3	0,4	коровы, нетели
2007 г. декабрь	13 месяцев	662	4	0,6	коровы, нетели
2008 г. октябрь	10 месяцев	860	7	0,81	коровы, нетели
2008 г. ноябрь	30 дней	930	3	0,32	коровы, нетели
2009 г. февраль	3 месяца	722	0	0	коровы, нетели
2009 г. сентябрь	6 месяцев	1434	77	5,5	старше 6 месяцев
2009 г. октябрь	30 дней	493	57	11,6	старше 6 месяцев
2010 г. май	7 месяцев	754	5	0,7	старше 6 месяцев
2010 г. июнь	30 дней	301	8	2,66	старше 6 месяцев
2010 г. август	60 дней	38	9	23,7	коровы
2010 г. сентябрь	30 дней	289	7	2,42	коровы
2010 г. ноябрь	60 дней	54	3	5,56	коровы

**Таблица 4**  
Динамика оздоровления крупного рогатого скота в неблагополучной по бруцеллезу общине Канакераван

Сроки анализа образцов крови	Перерывы в исследовании	Кол-во исследованных проб (РБТ)	Кол-во положительных проб	Зараженность, %	Возрастные группы
2006 г. ноябрь	7 месяцев	589	0	0	старше 2 лет
2006 г. декабрь	30 дней	143	0	0	коровы
2007 г. март	90 дней	513	15	2,92	старше 2 лет
2007 г. апрель	30 дней	40	0	0	коровы
2007 г. октябрь	6 месяцев	40	4	10,0	коровы
2007 г. декабрь	60 дней	487	0	0	старше 2 лет
2008 г. март	3 месяца	526	30	5,7	старше 2 лет
2008 г. май	60 дней	105	2	1,9	коровы
2008 г. октябрь	5 месяцев	197	20	10,15	коровы, нетели
2008 г. ноябрь	30 дней	300	8	2,26	старше 2 лет
2009 г. март	4 месяца	531	102	19,2	старше 2 лет
2009 г. апрель	30 дней	233	41	17,6	коровы
2009 г. май	30 дней	284	0	0	коровы, телки
2009 г. август	3 месяца	124	3	2,42	коровы
2009 г. ноябрь	3 месяца	79	14	17,7	коровы
2010 г. март	4 месяца	118	11	9,3	коровы, нетели
2010 г. май	60 дней	245	27	11,0	коровы, нетели
2010 г. октябрь	5 месяцев	412	3	0,73	старше 2 лет
2010 г. декабрь	60 дней	300	0	0	коровы, нетели

составило 9 голов. Это явилось результатом того, что пребывающие в скрытой стадии больные животные, будучи в стаде, заразили здоровых, тем самым увеличив число больных животных. Следовательно, в процессе оздоровления неблагополучного стада долгосрочные перерывы недопустимы, данный метод можно применять только при проверке здорового стада. Проанализировав динамику оздоровления крупного рогатого скота в неблагополучной по бруцеллезу общине Цгук, считаем необходимым отметить, что перерывы в серологических исследованиях не должны превышать 30-дневного срока. В данном случае процесс оздоровления составит не более 1,5–2 лет.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что в общине Цгук в 2008–2010 гг. были обнаружены и подвергнуты убою 284 нетели и коровы, что причинило фермерам существенный финансовый урон. По оценкам экспертов, убыток от одной дойной коровы, больной бруцеллезом, составляет 246 долл. США при условии получения прибыли от реализации мяса.

Научно доказано, что при искусственном заражении животных возбудителем бруцеллеза необходимое количество антител для положительной серологической реакции в организме животных возникает в период от 33 до 230 дней (скрытый период). Отсюда следует, что в результате частых проверок в неблагополучных стадах вовремя обнаруживается и подвергается убою вышедшее из скрытого периода поголовье, и этим сокращается период оздоровления. Данное следствие основывается на результатах очередных проверок по-

головья крупного рогатого скота всех перечисленных неблагополучных общин (табл. 1–4). Таким образом, в результате исследований, проводимых с промежутками в 6 месяцев (табл. 1), с 2006 по 2009 гг. был зарегистрирован динамический рост обнаружения больных животных: 16, 37, 63, 101, а в результате исследований, проводимых с промежутками в 17–45 дней, был выявлен динамический спад: 23, 18, 4, 5. Анализ представленных в табл. 2–4 результатов проведенных исследований в неблагополучных по бруцеллезу общинах Арташен, Кош и Канакераван аналогичен динамике оздоровления животных в общине Цгук.

В двух общинах (Цгук и Арташен) с промежутками в 1–2 месяца и 2–6 месяцев был проведен сопоставительный анализ результатов, было выявлено среднее арифметическое данных исследований, которое указывает на необходимость сохранения продолжительности перерывов при сборе проб крови.

Согласно проведенным подсчетам, среднее арифметическое больных животных, обнаруженных при исследованиях с перерывом до 6 месяцев, в общине Цгук составило 47,8 головы, а в Арташене, в случае перерывов от 2 до 11 месяцев — 44,4 головы. Тот же анализ больного поголовья с перерывами от 30 до 60 дней в общине Цгук составил 12,3 головы, а в Арташене — 23,3 головы. Как видим, различия очевидны. Разница между перерывами в исследованиях и количеством обнаруженных голов в других двух общинах также очевидна и не соответствует особенностям, характерным для заболевания бруцеллезом.

Перерывы в очередных проверках, а также количество вовлеченного поголовья разнохарактерны и нерегламентированы. Согласно полученным данным, в четырех отмеченных общинах процессы дезинфекции проводятся неудовлетворительно и должны осуществляться на уровне всех неблагополучных частных хозяйств. В процессе работы были выявлены причины распространения возбудителя бруцеллеза и интенсивность зараженности в частных хозяйствах неблагополучной общины Арташен.

Таким образом, из 25 голов крупного рогатого скота, принадлежащих отдельным владельцам, количество больных составило 8 голов (32%), из 19 голов — 17 больных голов (89%), из 11 голов — 7 больных голов (63,6%), из 23 голов — 12 больных голов (52%), из 48 голов — 16 голов (33,3%) и т.д. Исследование сыворотки крови, отобранной в феврале 2009 г. у 672 голов крупного рогатого скота в общине Арташен, показало, что 142 головы имели положительную реакцию в РБТ (21,1%). Проведенный в Республиканском ветеринарном диагностическом центре повторный анализ данных проб с помощью РА и РБТ подтвердил полученные результаты. Во время личных бесед с фермерами выяснилось, что обнаруженные во время очередных исследований больные коровы не все подверглись убою, что и послужило причиной широкого распространения инфекции. Отсюда следует, что в общинах, неблагополучных по бруцеллезу, не осуществляются необходимые последовательные мероприятия по борьбе с распространением инфекции.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показывают, что оздоровление неблагополучных по бруцеллезу общин осуществляется неправильно. Перерывы между

очередными проверками достаточно долгосрочны. Общины после обнаружения больного крупного рогатого скота вовремя не объявляются неблагополучными, проверки в них проводятся с перерывами в 5–6 месяцев, больные животные долгое время остаются в стадах и становятся причиной заражения нового, здорового поголовья, в итоге процесс оздоровления длится долгие годы. Предлагается серологические исследования всего половозрелого поголовья неблагополучных по бруцеллезу общин проводить с перерывами в 30 дней, подвергая больных животных убою в течение 10–15 дней, проводить обязательную дезинфекцию в неблагополучных хозяйствах, дворах и хлевах. Исходя из требований Евразийского экономического союза, необходимо издание в Армении нового указа по борьбе с бруцеллезом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багиян Г.Л. Картина обратного анализа эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Республике Армения / *Агронаука*. — 2009. — № 9–10. — С. 427–430.
2. Багиян Г.Л., Ширванян Ю.А., Ширванян А.Ю. Заболеваемость крупного рогатого скота бруцеллезом по областям Республики Армения за 2008 год / *Известия ГАУА*. — 2009. — № 3. — С. 70–73.
3. Гладков А.Д. Опыт оздоровления хозяйств от бруцеллеза животных / *Ветеринария*. — 1970. — № 8. — С. 50–52.
4. Зиновьев Н.В., Сафронов Н.В., Студенцов К.П. Пути к искоренению бруцеллеза в Казахстане / *Ветеринария*. — 1970. — № 7. — С. 48–49.
5. Ширванян А.Ю., Багиян Г.Л. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу мелкого и крупного рогатого скота в Республике Армения / *Агронаука*. — 2009. — № 1–2. — С. 48–53.



УДК 619:616.98:578.832.1:636.52/.58:616-091.8

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА У КУР, ВЫЗВАННОГО ИЗОЛЯТОМ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1

В.Ю. Сосипаторова<sup>1</sup>, Д.А. Алтунин<sup>2</sup>, М.А. Циванюк<sup>3</sup>, И.А. Чвала<sup>4</sup>

<sup>1</sup> биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>2</sup> ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: altunin@arriah.ru

<sup>3</sup> научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

<sup>4</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

#### РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по изучению клинических признаков заболевания и патоморфологических изменений органов кур на макро- и микроуровне после интраназального заражения изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1. С помощью иммуногистохимического метода осуществили идентификацию антигена вируса в пораженных тканях птиц.

Ключевые слова: грипп птиц, H5N1, экспериментальное заражение, гистология, иммуногистохимия.

UDC 619:616.98:578.832.1:636.52/.58:616-091.8

## EXAMINATION OF PATHOLOGICAL PROCESS PECULARITIES CAUSED BY A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1 ISOLATE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS IN CHICKENS

V.Yu. Sosipatorova<sup>1</sup>, D.A. Altunin<sup>2</sup>, M.A. Tsivanuk<sup>3</sup>, I.A. Chvala<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Veterinarian, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: altunin@arriah.ru

<sup>3</sup> Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

#### SUMMARY

Data on examination of chickens intranasally infected with A/duck/Altai/469/14 H5N1 isolate of avian influenza virus for clinical signs and microscopic and gross pathomorphological lesions in their organs are given in the paper. The virus antigen was identified in chicken tissue lesions by immunohistochemical method.

Key words: avian influenza, H5N1, experimental infection, histology, immunohistochemistry



### ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ

**Моно и поливалентные вакцины для профилактики инфекционных болезней КРС:**

- вирусная диарея,
- инфекционный ринотрахеит,
- парагрипп-3,
- ротавирусная инфекция,
- коронавирусная инфекция,
- против ящура всех типов.
- бешенство.

**Диагностика заболеваний КРС проводится по следующим направлениям:**

- Серологические исследования (ИФА, РМН, РТГА, РСК, РДП и др.) с использованием тест-систем отечественного и импортного производства.

- Выявление генома возбудителей вирусных и бактериальных инфекций КРС в ПЦР.

- Проведение вирусологических исследований: выделение возбудителя инфекции, изучение биологических свойств вирусов (изолятов).

- Проведение бактериологических исследований: выделение и идентификация выделенного возбудителя, определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

- Определение антител к вирусу ящура типов А22, О1, С1, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3,

Определение антител к неструктурным белкам вируса ящура;

Обнаружение антигена и генома вируса ящура; - Лабораторная диагностика губкообразной энцефалопатии КРС гистологическим и иммунологическим методами.

- Оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам лабораторий и животноводческих предприятий, разработка мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней КРС.

**По вопросам проведения исследований обращаться по тел.: (4922) 26-15-25 (доб. 21-35)**



## ВВЕДЕНИЕ

Грипп птиц (ГП) — это острое контагиозное вирусное заболевание, характеризующееся общим угнетением, отеками, множественными кровоизлияниями и поражением внутренних органов. По структуре вируса гриппа представляет собой сегментированный, отрицательно-полярный, одноцепочечный РНК-вирус, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Influenza A virus* (тип А). На основании антигенного родства поверхностных белков вирусы ГП типа А разделены на 16 подтипов по гемагглютинуину (НА) и на 9 подтипов по нейраминидазе (НА), а по особенностям патогенеза классифицированы на две основные группы: высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) и низкопатогенный грипп птиц (НПГП) [3]. Высокопатогенные формы вируса относятся к подтипам H5 и H7 и способны вызывать инфекционный процесс с летальностью среди птиц отряда куриных до 100% [4, 5, 8].

Вирусы гриппа птиц имеют широкое географическое распространение и являются причиной эпизоотий и пандемий среди многочисленных видов домашних и диких птиц во всем мире. В течение 2005–2010 гг. на территории Российской Федерации заболевание регистрировали в популяциях диких и домашних птиц Сибирского, Уральского, Южного, Северо-Кавказского, Центрального и Дальневосточного федеральных округов. С 2008 по 2013 гг. случаев ВПГП в птицеводческих хозяйствах не выявляли, а в сентябре 2014 г. в Алтайском крае была зафиксирована вспышка острой инфекции домашних кур, уток и гусей в личных подворьях граждан, вызванная заносом вируса гриппа А/H5N1 из Азиатского региона [6].

Напряженная эпизоотическая ситуация в ряде стран мира, распространение болезни в новые эколого-географические регионы, продолжающаяся эволюция вируса и возможность инфицирования различных видов птиц и млекопитающих по-прежнему выделяют грипп птиц среди прочих особо опасных и экономически значимых болезней [9]. Поэтому изучение патобиологии природных изолятов вируса ГП актуально для понимания механизмов патогенеза инфекции и оценки вирусного тропизма в тканях у восприимчивой домашней птицы, а также для прогнозирования эпизоотической опасности вируса.

Целью данного исследования является изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса ГП А/duck/Altai/469/14 H5N1.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вirus. В работе использовали изолят вируса ГП А/duck/Altai/469/14/H5N1, выделенный из образцов биологического материала от домашней утки, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из Алтайского края в 2014 г. Вирусовыделение проводили в 10-сут. эмбрионах СПФ-кур. Из биологического материала готовили 10% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) и вводили в аллантаоисную полость куриных эмбрионов (КЭ) в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. От эмбрионов, погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований. Для заражения цыплят использовали вирусный материал, полученный после второго пассажа в 10-сут. КЭ с титром 8,7 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Экспериментальное заражение птиц. Не иммунных к вирусу гриппа 2-месячных цыплят яичной породы разделили на экспериментальную (12 голов)

и контрольную (3 головы) группы. Цыплят обеих групп содержали в изолированных боксах со свободным доступом к корму и воде. Экспериментальное заражение проводили интраназальным способом как наиболее приближенным к естественным условиям в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Птицам контрольной группы, также интраназально, вводили по 1,0 мл ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур. Длительность опыта составила 5 сут., на протяжении которых ежедневно с диагностическими целями из опытной группы убивали по 2 птицы путем декапитации. Убой цыплят контрольной группы проводили на 5 сут. после заражения тем же способом.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование. В ходе эксперимента от павших, убитых с диагностическими целями и незараженных вирусом ГП цыплят отбирали образцы головного мозга, мозжечка, трахеи, легких, сердца и тонкого кишечника размером 0,5×0,5×0,5 см. Препараты фиксировали в смеси спирт-формол по Шафферу, через 48 ч осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки. С помощью ротационного микротома Microm HM340E (Германия) готовили парные срезы тканей органов кур толщиной 5 мкм. Один из препаратов подвергали окраске гематоксилином и эозином, а его дубликат — иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию [5, 7].

ИГХ-окрашивание осуществляли с применением 2-этапного полимерного метода [1]. Препараты парафиновых срезов подвергали предварительной депарафинизации и регидратации. Затем осуществляли демаскировку (раскрытие) антигена путём выдерживания стекол в цитратном буфере рН 6,0 (Bio-Optica, Италия) на водяной бане при температуре 98°C в течение 25 мин.

Следующие этапы реакции осуществляли по схеме, описанной в работе И.В. Бахчина [2]. В качестве первичных антител использовали очищенную фракцию иммуноглобулинов G (IgG) сыворотки крови кролика против вируса ГП А/H5N1. Контрольные препараты срезов обрабатывали нормальной сывороткой крови кролика, не содержащей антител к ГП. Для визуализации реакции антиген — антитело применялась полимерная система детекции UltraVision (Lab Vision, США). В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), окрашивание препаратов осуществляли с помощью гематоксилина Майера, стекла заключались в среду BioMaunt (Bio-Optica, Италия). Микроскопическое исследование образцов проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E C2+ (Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения патогенеза инфекции у кур, вызванной изолятом вируса ГП А/duck/Altai/469/14/H5N1, за птицей было установлено ежесуточное клиническое наблюдение. Первые 24 ч после заражения характерных клинических признаков болезни не наблюдали. Через 48 ч у инфицированных цыплят отмечали угнетенное состояние, взъерошенность перьев, вялость, потерю аппетита, затрудненное дыхание, диарею. Через 72 ч после начала эксперимента произошло резкое снижение активности птиц, появилась отечность подкожной клетчатки в области шеи, начал развиваться цианоз лап и гребня.

Через 4 сут. в опытной группе был отмечен падеж цыплят — погибло 2 особи, у выживших птиц (2 головы) наблюдали выделение слизи из ротоглотки, хрипы, ярко выраженный цианоз неоперенной части кожи

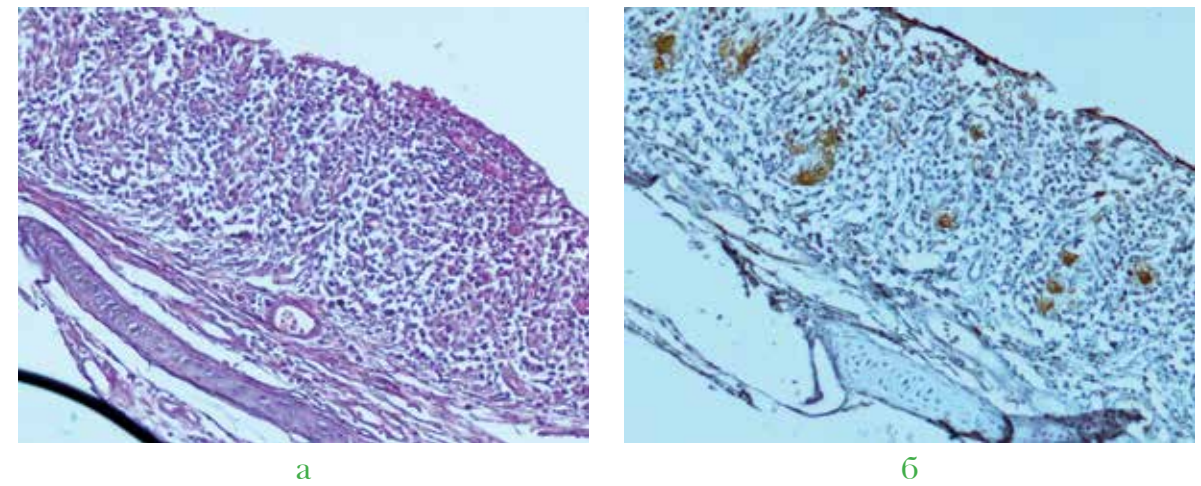


Рис. 1. Трахея цыпленка через 2 сут. после экспериментального заражения: а — парафиновый срез, окр. гематоксилин и эозин, ок. ×10, об. ×15; б — парафиновый срез, ИГХ окр. ДАБ и гематоксилин, ок. ×10, об. ×15

с последующей гибелью цыплят на 5 сут. эксперимента. Приведённые данные позволили охарактеризовать течение болезни как острое.

В ходе опыта в динамике оценивали патоморфологические изменения органов павших и убитых с диагностическими целями птиц, имевших клинические признаки болезни, характерные для ГП. Через 48 ч после инфицирования в основном регистрировали умеренные изменения органов пищеварительной и выделительной систем: полнокровные тёмно-красного цвета почки, точечные кровоизлияния в 12-перстной кишке, анемию печени.

Через 3–4 сут. при вскрытии отмечали наличие студенистого инфильтрата в подкожной клетчатке в области шеи. В грудобрюшной полости наблюдали дряблость сердечной мышцы и скопление в сердечной сорочке жидкости соломенного цвета. Трахея была заполнена слизистыми массами, легкие кровенаполнены. В железистом желудке отмечали воспаление с наличием кровоизлияний под серозной и в слизистой оболочках, в паренхиме поджелудочной железы выявляли крупноочаговые кровоизлияния. Почки ги-

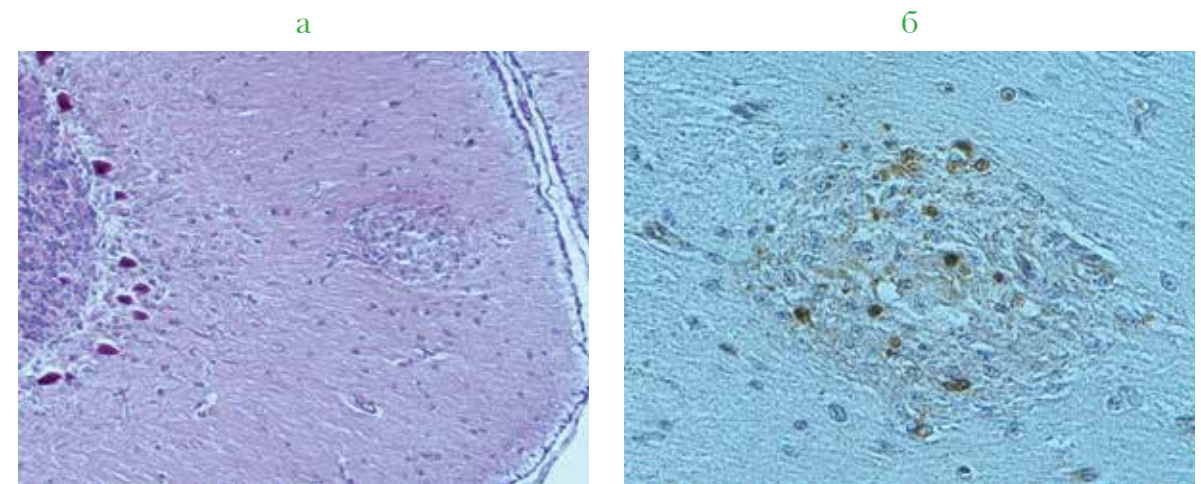
пермированы, отечны, с признаками нефрита. Печень полнокровная, местами неравномерно окрашена. При вскрытии черепной коробки выявляли полнокровие сосудов и отёк ткани мозга.

Таким образом, процесс заболевания, вызванный изолятом А/duck/Altai/469/14 H5N1, протекал стремительно и носил деструктивный характер, что соответствует выводам предыдущих работ о высокой патогенности вируса ГП А/H5N1 для домашних кур [2, 4, 5].

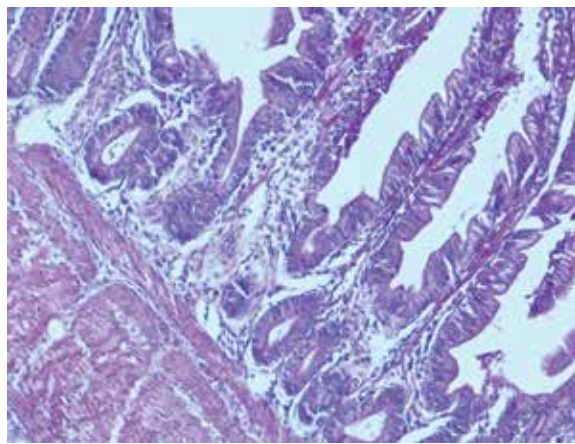
Гистологическое исследование трахеи цыплят, инфицированных изолятом вируса ГП А/duck/Altai/469/14 H5N1, показало адгезию реснитчатого слоя, катаральное воспаление и отек слизистого эпителия за счет инфильтрации лимфоцитами (рис. 1а). В очагах геморагий при гистохимическом окрашивании идентифицировали наличие вируса (рис. 1б).

Паренхима ткани лёгких и бронхов зараженных птиц имела выраженную отечность. В просвете парабронхов выявляли скопления эритроцитов, слущенных эпителиоцитов и клеточного детрита. В альвеолярных ходах регистрировали очаги некроза. ИГХ-исследование показало наличие вируса возбудителя ГП в пораженных

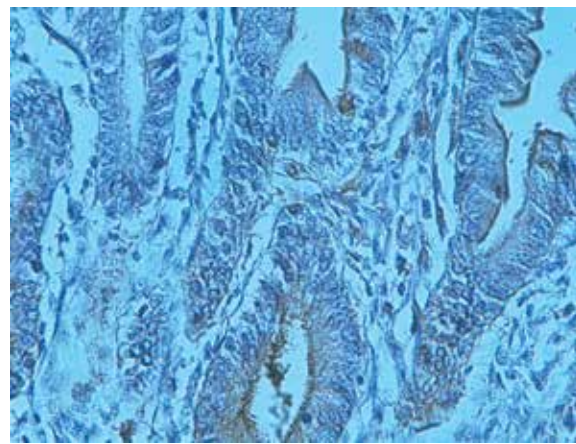
Рис. 2. Мозжечок цыпленка через 2 сут. после экспериментального заражения: а — парафиновый срез, окр. гематоксилин и эозин, ок. ×10, об. ×15; б — парафиновый срез, ИГХ окр. ДАБ и гематоксилин, ок. ×10, об. ×40







а



б

Рис. 3. Тонкий кишечник цыпленка через 2 сут. после экспериментального заражения:

а — парафиновый срез, окр. гематоксилин и эозин, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 15$ ;  
б — парафиновый срез, ИГХ окр. ДАБ и гематоксилин, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$

альвеоцитах и среди десквамированных клеток слизистой оболочки парабронхов.

В головном мозге цыпленка опытной группы наблюдали область периваскулярной инфильтрации лимфоцитами. В ткани мозжечка в молекулярном слое регистрировали пролиферацию глиальных клеток на фоне разрушившихся нейронов (рис. 2).

Гистологические изменения тонкого кишечника кур, вызванные вирусом ГП A/duck/Altai/469/14 H5N1, проявлялись в виде деструкции ворсинок и гиперплазии стромы гладкомышечной оболочки. При ИГХ-окрашивании вирусный антиген идентифицировали в эпителиальном слое ворсинок и в клетках люберкюновых желёз (рис. 3).

При гистологическом исследовании сердца зараженных птиц выявляли мультифокальные поражения, отек и дегенерацию волокон миокарда. В очагах некроза миоцитов выявляли антиген вируса ГП подтипа H5N1.

Таким образом, ИГХ-анализ тканей через 48 ч после введения инфекционного агента показал размножение вируса в эндотелии сосудов головного мозга, глиальных клетках мозжечка, эпителии трахеи, эпителиоцитах и альвеоцитах легких, миоцитах сердца, слизистом слое и просвете желез тонкого кишечника. Антиген вируса ГП A/H5N1 выявляли в тканях с микроскопическими поражениями в виде очагов некроза и умеренного воспаления, при этом выраженных клинических симптомов болезни после 48 ч воздействия возбудителя на птиц не наблюдали.

Подобные патоморфологические изменения органов кур с ИГХ-анализом тканей показаны в работе И.В. Бахчина и коллег, где для интраназального заражения использовали изолят ВППП A/grebe/Tyva/433/10/H5N1, который относится к той же группе эпизоотических вирусов ГП азиатского происхождения, что и исследуемый возбудитель [2].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что изолят A/duck/Altai/469/14 H5N1 вы-

зывает острое генерализованное заболевание у кур с характерными для ГП клиническими признаками и патоморфологическими поражениями органов с локализацией вируса в тканях респираторной, пищеварительной, нервной и сердечно-сосудистой систем.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммуногистохимические методы. Руководство / ред. G.L. Kumar, L. Rudbeck; пер. с англ. — М.: У Никитских ворот, 2011. — 223 с.
2. Патоморфологические изменения у кур при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц A/H5N1 / И.В. Бахчин, И.А. Чвала, М.А. Волкова [и др.] // Вестник ветеринарии. — 2014. — № 1 (68). — С. 47–51.
3. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России; под ред. Д.К. Львова. — М.: Мед. информ. агентство, 2013. — 1197 с.
4. Чвала И.А. Особенности гриппа птиц A/H5N1 у кур // Ветеринария. — 2012. — № 12. — С. 27–28.
5. Bertran K., Dolz R., Majó N. Pathobiology of avian influenza virus infection in minor gallinaceous species: a review // Avian Pathol. — 2014. — Vol. 43, № 1. — P. 9–25.
6. OIE. Highly pathogenic avian influenza, Russia: Immediate notification (30/09/2014); Follow-up report No. 1 (08/10/2014); Follow-up report No. 2 (05/11/2014). — URL: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=16421](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=16421).
7. Pantin-Jackwood M.J. Immunohistochemical staining of avian influenza virus in tissues // Animal Influenza Virus: Methods in Molecular Biology / ed. E. Spackman. — London, 2014. — Vol. 1161. — P. 51–58.
8. Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds // Rev. Sci. Techn. OIE. — 2009. — Vol. 28. — P. 113–136.
9. Yin J., Liu S., Zhu Y. An overview of the highly pathogenic H5N1 influenza virus // Virologica Sinica. — 2013. — Vol. 28, № 1. — P. 3–15.

УДК 619:578.825.1:578.5

## АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛНОГО ГЕНОМА ШТАММА «О» ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

А.А. Козлов<sup>1</sup>, Н.Г. Зиняков<sup>2</sup>, С.Н. Колосов<sup>3</sup>, Н.С. Мудрак<sup>4</sup>, И.А. Чвала<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zinyakov@arriah.ru

<sup>3</sup> главный научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kolosov@arriah.ru

<sup>4</sup> главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mudrak@arriah.ru

<sup>5</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Представлены данные по определению и анализу нуклеотидной последовательности полного генома штамма «О» вируса инфекционного ларинготрахеита птиц. В ходе картирования нуклеотидной последовательности полного генома выявлен ряд уникальных значимых нуклеотидных особенностей в генах, кодирующих поверхностные белки, ответственные за взаимодействие с клеточными рецепторами. Показана принадлежность штамма «О» к филогенетической группе 1, подгруппе 1 (1.1). В ходе работы установлено генетическое родство отечественного вакцинного штамма «О» с другими широко используемыми вакцинными штаммами в мировом птицеводстве, такими как Serva, Cover, Hudson и Fowl laryngo. Картированная нуклеотидная последовательность депонирована в международную базу данных GenBank под номером KU128407 и является первой полной генетической характеристикой отечественного вакцинного штамма.

Ключевые слова: вирус инфекционного ларинготрахеита, полногеномное секвенирование, последовательность полного генома, картирование генома, филогенетический анализ.

UDC 619:578.825.1:578.5

## ANALYSIS OF WHOLE GENOME SEQUENCE OF STRAIN "O" OF AVIAN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS

A.A. Kozlov<sup>1</sup>, N.G. Zinyakov<sup>2</sup>, S.N. Kolosov<sup>3</sup>, N.S. Mudrak<sup>4</sup>, I.A. Chvala<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zinyakov@arriah.ru

<sup>3</sup> Chief Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kolosov@arriah.ru

<sup>4</sup> Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mudrak@arriah.ru

<sup>5</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

### SUMMARY

Data on identification and analysis of whole genome nucleotide sequence of strain «O» of avian infectious laryngotracheitis virus are demonstrated. In the process of the whole genome sequence mapping a number of unique and significant nucleotide properties has been identified in genes that code surface proteins responsible for interacting with cell receptors. Strain «O» has been demonstrated to belong to phylogenetic group 1 subgroup 1 (1.1). Genetic relatedness of domestic strain «O» to other vaccine strains widely used in global poultry industry such as Serva, Cover, Hudson and Fowl laryngo has been determined. The mapped nucleotide sequence has been deposited in the international GenBank database under the accession number KU128407. It is the first complete genetic characterization of the domestic vaccine strain.

Key words: infectious laryngotracheitis virus, whole genome sequencing, whole genome sequence, gene mapping, phylogenetic analysis.



**ВВЕДЕНИЕ**

Инфекционный ларинготрахеит (ИЛТ) — экономически значимое респираторное заболевание сельскохозяйственной птицы, наносящее ущерб птицеводству во всём мире. Возбудителем является ДНК-содержащий вирус *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1) семейства *Herpesviridae*, подсемейства *Alphaherpesvirinae* [6]. На данный момент в GenBank опубликованы последовательности полных геномов десяти производственных штаммов вируса ИЛТ и десяти вирулентных штаммов, выделенных на территории США, Австралии и Китая. Данные по полногеномному секвенированию российских штаммов ИЛТ отсутствуют. Чтобы получить более полную информацию о генетическом разнообразии вируса ИЛТ в разных географических регионах, в настоящей работе была определена полная последовательность генома отечественного вакцинного штамма «О» и проведен её сравнительный анализ с последовательностями других штаммов, опубликованных в GenBank.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для получения вирусосодержащей суспензии заражали 11-сут. эмбрионы кур, свободных от патогенных факторов (СПФ), на хорионаллантоисную оболочку (ХАО). Через 7 сут. после заражения эмбрионы вскрывали и отбирали поражённую ХАО. Полученный материал диспергировали и подвергали однократной за-

морозке и оттаиванию. Очистку и концентрирование вирусосодержащего материала проводили с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [1].

Для выделения ДНК из очищенного материала применяли набор DNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение первичной структуры генома проводили методом пирофосфатного секвенирования «454 Life Sciences» на автоматическом секвенаторе GS Junior (Roche, Германия) согласно протоколам изготовителя. Для сборки последовательности вирусного генома использовали программное обеспечение GS De Novo Assembler (454 Life Science Corp.).

С помощью программы BioEdit 7.1.9 ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)) было выполнено выравнивание последовательности полного генома штамма «О» и последовательностей штаммов, представленных в базе данных GenBank (табл. 1). С помощью программы MEGA 3.1 ([www.megasoftware.net/mega.php](http://www.megasoftware.net/mega.php), алгоритм построения UPGMA) была получена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения анализируемых штаммов (рис. 2).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Длина нуклеотидной последовательности полного генома штамма «О» составляет 153634 п.н. (G+C 48,09%, A+T 51,91%). По своей структуре геном состоит из уникальной длинной области (UL) (1–113921 п.н.) и уникальной короткой области (US) (126732–139825 п.н.), окружённой короткими областями внутреннего инвертированного повтора (IRS) и концевой инвертированного повтора (TRS) (рис. 1).

Сравнение последовательности штамма «О» с последовательностью референтного штамма *Serva* показало, что полученный геном содержит 79 открытых рамок считывания (ORF) с межгенными участками (рис. 1). При этом в ходе картирования нуклеотидной последовательности полного генома штамма «О» был выявлен ряд уникальных особенностей, отличающих данный штамм от других, представленных в табл. 1. Так, в позиции 18373 н. гуанин (G) меняется на аденин (A) (область гена UL50), в позициях 74684 и 75877 н. также G меняется на A (область гена UL43), что не приводит к изменению аминокислотного состава, при этом в генах US6 и US9, кодирующих поверхностные белки, ответственные за взаимодействие с клеточными рецепторами, выявлены значимые изменения нуклеотидной последовательности. Так, в гене US6 в позиции 135992 н. замена G на A приводит к смене аминокислоты глицин (G позиция 358 а.к.) на глутаминовую кислоту (E). В областях инвертированных повторов обнаружены нуклеотидные вставки в позициях 126719–126722 н. (IRS) и 139835–139838 н. (TRS), при этом последняя приводит к удлинению рамки считывания гена US9 вследствие смещения стоп-кодона. Кодированная данным геном аминокислотная последовательность удлиняется на 20 а.к. (с 260 до 280 а.к) и полностью меняет состав аминокислот в позиции 240–280 а.к.

Как видно из табл. 2, геном штамма «О» показывает высокий уровень нуклеотидного сходства (99,97–99,98%) с вакцинными штаммами *Serva*, *Cover*, *Hudson* (табл. 1), а также с *Fowl laryngo*, и сравнительно более низкий уровень сходства с вакцинами *LT-Ivax*, *IVAX* и штаммом *K317* (99,90%). Наиболее низкий уровень

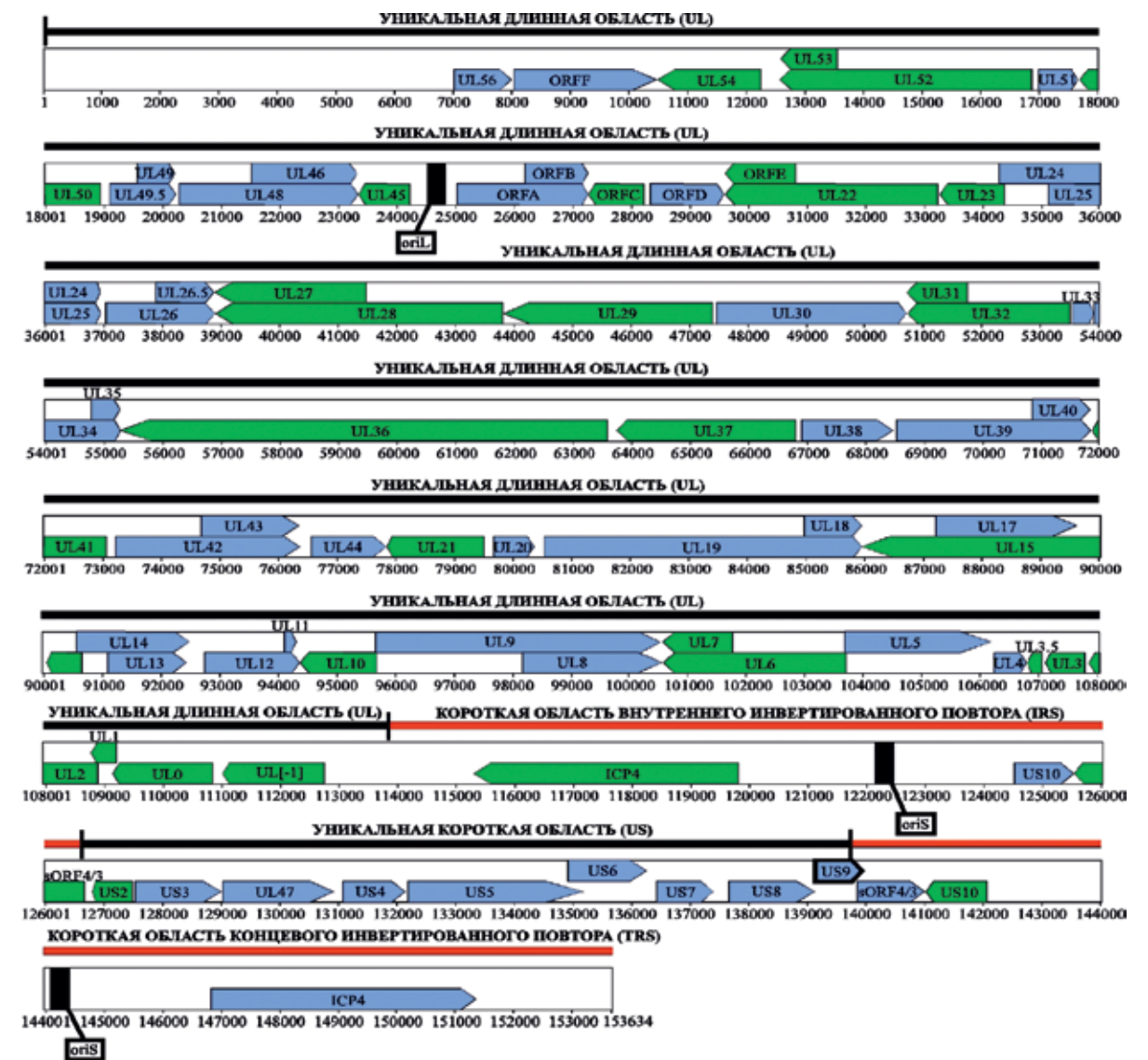


Рис. 1. Картирование нуклеотидной последовательности полного генома штамма «О» вируса ИЛТ (относительно последовательности референтного штамма *Serva* HQ630064) с обозначением генов, их расположения в геноме и указанием направления считывания с них аминокислотной последовательности, а также отмечены сайты инициации репликации вирусной ДНК (*oriS* и *oriL*) [4]

нуклеотидного сходства (99,91%) генома штамма «О» наблюдается с вакцинными штаммами SA2 и A20.

Исходя из филогенетических отношений, показанных на рис. 2, и принимая во внимание время выделения (или депонирования) того или иного штамма, было проведено деление большей части штаммов на три филогенетические группы и две подгруппы. Высокое значение *Bootstrap* критерия (показатель достоверности топологии узла ветвления) в ключевых точках ветвления (рис. 2) подтверждает правомерность данного деления.

Группа 1 предположительно включает две подгруппы:

- подгруппа 1.1 — штаммы *Cover* (выделен приблизительно в 1958 г.) [6], *Hudson* (1962 г.) [6], *Fowl laryngotracheitis* (1991 г.) [5], *Serva* (точное время вы-

деления этого штамма неизвестно) [6], 63140C08BR (2006 г.) [5], ACC78 (2008 г.) [3] и штамм «О» (199 г.) [2];

- подгруппа 1.2 — LT-Ivax LP (1991 г.) [5], IVAX (1991 г.) [5], 81658 (2010 г.) [5] и штамм «USDA»; а также в группу 1 включён штамм из Китая — LJS09 (2009 г.) [4].

Группа 2: штаммы SA2 (1966 г.) [6] и A20 (1983 г.) [6].

Группа 3: штаммы CSW-1 (1970 г.) [7] и V1-99 (1999 г.) [7].

Кроме того, одной из причин появления штаммов, образующих отдельные филогенетические ветви, является рекомбинация между штаммами разных филогенетических групп. Так, например, штаммы CSW-1 и V1-99 [6, 7], ACC78 и CL9 [6, 3], и 1874C5 являются рекомбинантами [6] (рис. 2).

Приведённое деление на филогенетические группы несколько отличается от представленного ранее K.R. Menendez и соавт. [6]. В их работе штаммы, входящие в первую филогенетическую группу (рис. 2), разделены на две группы (клады). Учитывая то, что они более близки по отношению друг к другу, чем к другим филогенетическим группам, в данной работе выделили их в общую группу, но в отдельные подгруппы. В связи с низким уровнем нуклеотидного сходства штаммов SA2 и A20 с CSW-1 и V1-99 (99,53–99,57%) они также были выделены в отдельные группы (рис. 2).

Таблица 1  
Штаммы вируса ИЛТ, представленные в GenBank

№	Название	Происхождение	Номер в GenBank
1	EU/CEO vac. strain <i>Serva</i>	Европа	HQ630064
2	Aus/CEO vac. strain SA2	Австралия	JN596962
3	Aus/TCO vac. strain A20	Австралия	JN596963
4	Aus/virul. strain CL9	Австралия	JN804827
5	Aus/virul. strain ACC78	Австралия	JN804826
6	Aus/virul. strain CSW-1	Австралия	JX646899
7	Aus/virul. strain V1-99	Австралия	JX646898
8	USA/virul. strain USDA	США	JN542534
9	USA/strain TCO vac. LT-Ivax	США	JN580315
10	USA/CEO vac. LaryngoVac (strain Cover)	США	JQ083494
11	USA/virul. strain 1874C5	США	JN542533
12	USA/virul. strain 81658	США	JN542535
13	USA/CEO vac. Fowl laryngo	США	JN580317
14	USA/CEO vac. TRVX (strain Hudson)	США	JN580313
15	USA/strain TCO vac. IVAX	США	JN580312
16	USA/virul. strain 63140C08	США	JN542536
17	USA/CEO vac. LT Blen (strain Hudson)	США	JQ083493
18	Chi/virul. strain LJS09	Китай	JX458822
19	Chi/vac. strain K317	Китай	JX458824
20	Chi/strain WG	Китай	JX458823
21	Rus/CEO vac. strain O (FGBI «ARRIAH»)	РФ	KU128407

Таблица 2  
Различия между нуклеотидными последовательностями геномов вакцинных штаммов вируса ИЛТ (в процентах %)

№	Название	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	EU/CEO vac. strain Serva	X	0.48	0.47	0.10	0.03	0.03	0.02	0.09	0.02	0.10	0.02
2	Aus/CEO vac. strain SA2	0.48	X	0.02	0.46	0.49	0.49	0.48	0.45	0.48	0.56	0.49
3	Aus/TCO vac. strain A20	0.47	0.02	X	0.45	0.49	0.49	0.48	0.45	0.48	0.55	0.49
4	USA/strain TCO vac. LT-lvax	0.10	0.46	0.45	X	0.10	0.10	0.09	0.00	0.09	0.17	0.10
5	USA/CEO vac. LaryngoVac (strain Cover)	0.03	0.49	0.49	0.10	X	0.01	0.01	0.10	0.01	0.11	0.03
6	USA/CEO vac. Fowl laryngo	0.03	0.49	0.49	0.10	0.01	X	0.00	0.10	0.00	0.10	0.02
7	USA/CEO vac. TRVX (strain Hudson)	0.02	0.48	0.48	0.09	0.01	0.00	X	0.09	0.00	0.10	0.02
8	USA/strain TCO vac. IVAX	0.09	0.45	0.45	0.00	0.10	0.10	0.09	X	0.09	0.17	0.10
9	USA/CEO vac. LT Blen (strain Hudson)	0.02	0.48	0.48	0.09	0.01	0.00	0.00	0.09	X	0.10	0.02
10	Chi/vac. strain K317	0.10	0.56	0.55	0.17	0.11	0.10	0.10	0.17	0.10	X	0.10
11	Rus/CEO vac. strain O (FGBI «ARRIAH»)	0.02	0.49	0.49	0.10	0.03	0.02	0.02	0.10	0.02	0.10	X

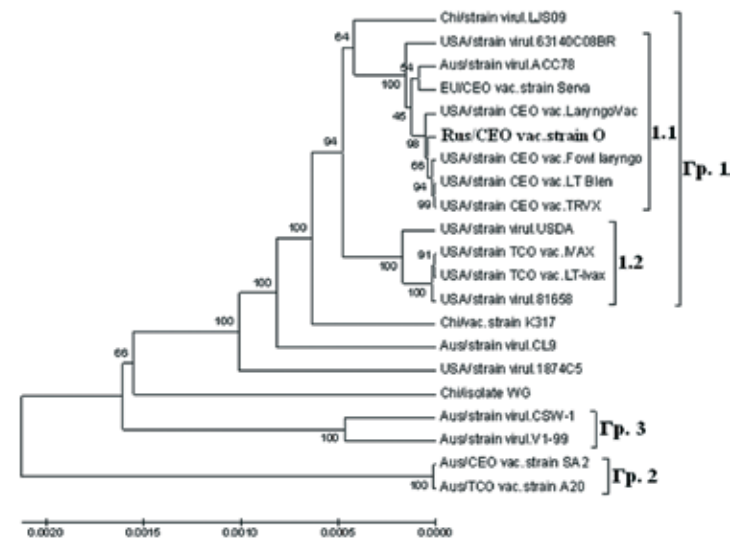


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая филогенетические отношения анализируемых штаммов вируса ИЛТ

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была определена нуклеотидная последовательность полного генома штамма «О» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») вируса ИЛТ.

Полученная последовательность была картирована относительно референтного штамма Serva и опубликована в GenBank (KU128407).

В результате филогенетического анализа была показана принадлежность штамма «О» к филогенетической группе 1, подгруппе 1 (1.1).

Анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов использованных в работе штаммов вируса ИЛТ показал высокий уровень нуклеотидного сходства штамма «О» с штаммами Serva, Cover, Hudson, а также с Fowl laryngo (99,97–99,98%). В ходе картирования нуклеотидной последовательности полного генома штамма «О» в генах, кодирующих поверхностные белки, ответственные за взаимодействие с клеточными рецепторами, был выявлен ряд уникальных особенностей: значимая нуклеотидная замена в гене

US6 и вставка четырех нуклеотидов в конечном инвертированном повторе, приводящая к удлинению рамки считывания гена US9 и изменению состава кодируемой данным геном аминокислотной последовательности.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Очистка и концентрирование вируса инфекционного ларинготрахеита птиц / А.А. Козлов, Д.Б. Андрейчук, А.Н. Андриясова, Н.С. Мудрак // Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности: сб. материалов 2-й Междунар. науч. конф. молодых ученых. — Гвардейский, Казахстан, 2014. — С. 125–128.
2. Пат. 2207372 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> C12N 7/00. Штамм «О» вируса инфекционного ларинготрахеита птиц для изготовления диагностических и вакцинных препаратов / А.В. Бочарников, В.Ю. Кулаков, А.В. Борисов [и др.]; ФГУ «ВНИИЗЖ». — № 2002105552/13; заявл. 28.02.2002; опубл. 27.06.2003.
3. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses / S.W. Lee, P.F. Markham, M.J. Coppo [et al.] // Science. — 2012. — Vol. 337, № 6091. — P. 188.
4. Complete genome sequence of the first Chinese virulent infectious laryngotracheitis virus / C. Kong, Y. Zhao, X. Cui [et al.] // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8, № 7. — URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0070154>.
5. Genomic sequence analysis of the United States infectious laryngotracheitis vaccine strains chicken embryo origin (CEO) and tissue culture origin (TCO) / M. García, V. Volkening, S.M. Riblet [et al.] // Virology. — 2013. — Vol. 440. — P. 64–74.
6. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review / K.R. Menendez, M. García, S. Spatz, N.L. Tablante // Avian Pathology. — 2014. — Vol. 43, № 2. — P. 108–117.
7. Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of multiple past recombination events between infectious laryngotracheitis viruses / S.W. Lee, J.M. Devlin, J.F. Markham [et al.] // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8, № 2. — URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055121>.

УДК 619:616.98:578.826.1:616-073

# ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА АДЕНОВИРУСА ПТИЦ FAdV4/6/2009

О.С. Осипова<sup>1</sup>, М.А. Волкова<sup>2</sup>, Н.Г. Зиняков<sup>3</sup>, С.П. Лазарева<sup>4</sup>, В.Ю. Сосипаторова<sup>5</sup>, И.А. Чвала<sup>6</sup>

<sup>1</sup> ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: osipova@arriah.ru

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>3</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zinyakov@arriah.ru

<sup>4</sup> ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lazareva@arriah.ru

<sup>5</sup> ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>6</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Аденовирус птиц был изолирован из печени 154-суточных кур одного из хозяйств Краснодарского края в 2009 г. Вирус выделили на культуре клеток гепатомы петуха Леггорн с проявлением цитопатического действия и идентифицировали методом ПЦР с последующим секвенированием фрагмента гена гексона как аденовирус птиц вида С. При экспериментальном пероральном заражении 7-суточных бройлеров развивался синдром гидроперикардита.

Ключевые слова: аденовирус птиц, синдром гидроперикардита.

UDC 619:616.98:578.826.1:616-073

# CHARACTERIZATION OF AVIAN ADENOVIRUS FAdV4/6/2009 ISOLATE

O.S. Osipova<sup>1</sup>, M.A. Volkova<sup>2</sup>, N.G. Zinyakov<sup>3</sup>, S.P. Lazareva<sup>4</sup>, V.Yu. Sosipatorova<sup>5</sup>, I.A. Chvala<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: osipova@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>3</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zinyakov@arriah.ru

<sup>4</sup> Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lazareva@arriah.ru

<sup>5</sup> Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>6</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

### SUMMARY

Avian adenovirus was isolated from livers of 154-day-old hens on one farm located in the Krasnodar Krai in 2009. The virus was isolated in chicken Leghorn male hepatoma cell culture that exhibited cytopathogenic effect and identified as avian type C adenovirus by PCR followed by sequencing of hexon gene fragment. Hydropericardium syndrome developed in 7-day-old broiler chickens experimentally orally infected with the virus.

Key words: avian adenovirus, hydropericardium syndrome.



**ВВЕДЕНИЕ**

Аденовирусы птиц — безоболочечные ДНК-содержащие вирусы, относящиеся к роду *Aviadenovirus* семейства *Adenoviridae* [9]. По генетическим свойствам выделяют 5 видов аденовируса птиц (А, В, С, D и Е), а по перекрёстной активности в реакции нейтрализации — 12 серотипов [5, 8]. Различные штаммы и изоляты аденовирусов птиц отличаются по своим патогенным свойствам. FAdV-4 (аденовирус птиц вида С) может являться этиологическим агентом опасного заболевания цыплят-бройлеров — синдрома гепатита-гидроперикардита.

Впервые аденовирусный синдром гидроперикардита кур был зарегистрирован в 1987 г. в Пакистане, далее заболевание регистрировали в Индии, Японии, Мексике, странах Латинской Америки, Китае, Корее, а также в России [1–3, 6, 8, 10]. Наиболее восприимчивы к заболеванию цыплята-бройлеры 3–6-недельного возраста, но могут поражаться птицы старшего возраста [6, 8, 10]. Выявленные отдельные случаи заболевания 7–9-сут. цыплят связывают с вертикальной передачей вируса от родителей [4].

Заболевание характеризуется высокой контагиозностью и смертностью (до 70–80%). К основным признакам заболевания можно отнести скопление прозрачного, соломенно-окрашенного экссудата в перикарде, отёк легких, а также поражение печени и почек [7, 8, 11]. При гистологическом исследовании наиболее существенные изменения регистрировали в печени: образование очагов некроза, инфильтрация мононуклеаров, включая базофильные внутриклеточные тельца-включения в гепатоцитах [11, 13]. Наряду с этим имеются сообщения о выявлении непатогенных штаммов вируса. Так, в Канаде в 2004 г. от клинически здоровых цыплят-бройлеров был выделен непатогенный FAdV-4 [12]. Данные о роли FAdV-4 как первичного или вторичного патогена могут меняться в зависимости от способа введения вируса, возраста и породы птиц.

Целью работы являлось изучение биологических свойств (в том числе патогенности для цыплят-бройлеров) аденовируса птиц, выделенного от цыплят на одной из птицефабрик Краснодарского края в 2009 г.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Вирусодержащий материал.** 20% суспензия ткани печени в растворе Хенкса от кур из птицефабрики Краснодарского края РФ.

**Выделение вируса.** Для первичного выделения изолята аденовируса использовали культуру клеток гепатомы петуха Леггорн (LMH). Культивирование проводили с использованием среды DMEM/F-12 (Sigma)

с глутамином и 2% фетальной сыворотки. Определение титра инфекционной активности вируса в культуре клеток проводили по методу Кербера с использованием 10-кратных разведений вируса.

**Полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** Двухцепочечную ДНК аденовируса выделяли коммерческим набором NucleoS<sup>™</sup> («Биоком», Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию проводили с использованием прибора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Для выявления аденовируса с помощью ПЦР-РВ использовали праймеры и зонды, специфичные для вида С: FAdV4-433F: CCC-TAC-TGC-GGC-ACG-GCT-TA, FAdV4-608R: CCT-GGT-TGG-GAT-TGG-GGA-AGA, ДНК-зонд FAdV4-FAM:AC-CTC-CAA-AGA-CAC-GAC-GGC-GG.

**Секвенирование.** Подбор праймеров для амплификации гена гексона и последующего секвенирования осуществляли с помощью программы Oligo (v.3.3) по последовательности аденовируса птиц KR5 (HE608152). Очистку продуктов ПЦР от компонентов реакционной смеси проводили с использованием GF/F-фильтров. Секвенирование амплифицированного участка гена гексона аденовируса осуществляли на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя.

**Анализ результатов секвенирования.** Сравнительный анализ последовательностей участка гена гексона из базы данных GenBank и полученных ПЦР-ампликонов проводили с использованием пакета программ BioEdit (v.6.0.6, 2004 г.): Clustal W (выравнивание последовательностей) и Identity matrix (вычисление процента сходства последовательностей). Построение филогенетического дерева проводили с помощью алгоритма NJ (в том числе с использованием численного ресэмплинга «бутстреп») в реализации пакета MEGA, версия 3.1. Нумерацию нуклеотидных последовательностей использованного в работе гена гексона осуществляли относительно первого нуклеотида соответствующего гена, взятого из полногеномной нуклеотидной последовательности штамма KR5 (HE608152).

**Лабораторные животные.** В опыте использовали полученных из благополучного по инфекционным болезням птицеводства 7-сут. цыплят-бройлеров, не имеющих антител к аденовирусу птиц.

**Эксперимент на животных.** В опыте цыплята были разделены на три группы. Цыплятам из первой (опытной) группы (32 головы) перорально вводили культуральную жидкость, содержащую изолят аденовируса птиц, в дозе 5,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл. Цыплята из второй (контактной) группы в количестве 12 голов были подсажены к птицам опытной группы через 24 ч после инфицирования и содержались совместно с ними в течение 25 сут. (срок наблюдения). Третьей группе (26 голов) вводили по 1,0 мл культуральной жидкости (LMH), не содержащей вирус. Группы содержались в отдельных изолирующих боксах. Через 1, 3, 6, 9, 14, 20 и 26 сут. после инфицирования проводили убой 3 цыплят из контрольной группы, 2 цыплят из контактной группы и 3 цыплят из опытной группы для патологоанатомического исследования и отбора проб биоматериала.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Выявление антител к аденовирусу птиц проводили в непрямом варианте ИФА с использованием коммерческого набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» по инструкции производителя. Результат реакции считали положительным при

величине титра антител 450 и выше (за титр принимали величину, обратную разведению сыворотки).

**Гистологическое исследование.** Кусочки органов размером 0,5×0,5×0,5 см фиксировали 4% раствором формалина в 80% растворе этилового спирта в течение 48 ч и заключали в парафин. С парафиновых блоков получали срезы толщиной 5–7 мкм (микротом Microm HM340E, Германия). Готовые препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование препаратов производили на инвертированном конфокальном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E C2+ (Япония).

**Статистический анализ результатов.** Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При исследовании методом ПЦР-РВ проб печени 154-сут. кур, присланных на исследование из хозяйства Краснодарского края в 2009 г., был выявлен геном аденовируса птиц. Патологический материал был отобран от кур с признаками синдрома гепатита-гидроперикардита. Для выделения вируса в культуре клеток использовали 20% суспензию ткани печени в растворе Хенкса. Выделение и дальнейшую адаптацию вируса проводили на культуре клеток LMH. Патогенное действие вируса на культуру клеток LMH проявлялось в округлении клеток, разрушении цитоплазматических выростов между островками клеток, появлении плотных внутриклеточных включений (рис. 1).

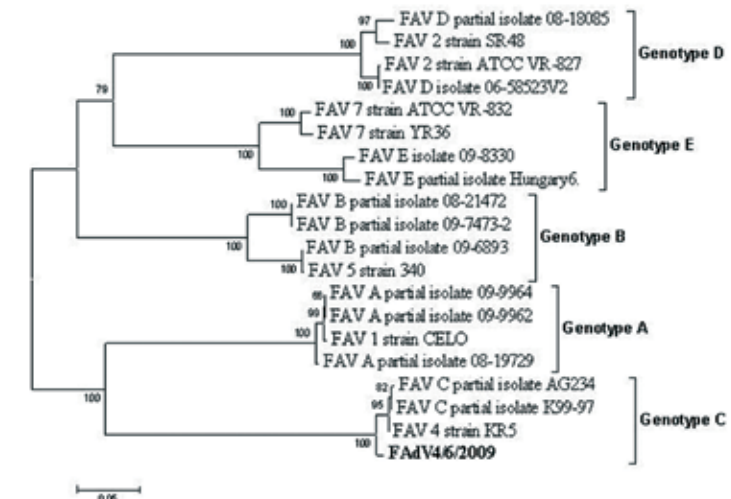
Поражение 80–90% монослой культуры клеток LMH наблюдали на 4–5 сут. после заражения. Титр вируса после трёх пассажей составил 6,25±0,25 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Контаминация изолята аденовируса птиц другими патогенами (вирусы гриппа птиц типа А, ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, инфекционной анемии цыплят, инфекционного ларинготрахеита, синдрома снижения яйценоскости-76, метапневмовирус птиц, реовирус, а также микоплазмы синовиа и галлисептикум) была исключена методом ПЦР. Отсутствие контаминации изолята аденовируса птиц бактериями и грибами было установлено микробиологическими методами. При дальнейшем культивировании в течение двух последующих пассажей (с 4 по 5) изолят FAdV4/6/2009 оставался стабильным, при этом титры инфекционной активности вируса были в пределах 6,58–7,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Для идентификации изолята аденовируса птиц с помощью специфических праймеров был дополнительно амплифицирован и секвенирован участок нуклеотидной последовательности гена гексона и проведено его

**Таблица 1**  
Результаты заражения цыплят изолятом аденовируса птиц

Группа	Сутки после заражения / количество павших цыплят					
	4	7	9	12	14	20
Опытная	2	1	0	1	1	1
Контактная	0	0	1	0	0	0



**Рис. 2.** Дендрограмма, построенная методом NJ по нуклеотидным последовательностям участка гена гексона (25–651 п. н.) штаммов и изолятов аденовируса птиц, представленных в GenBank

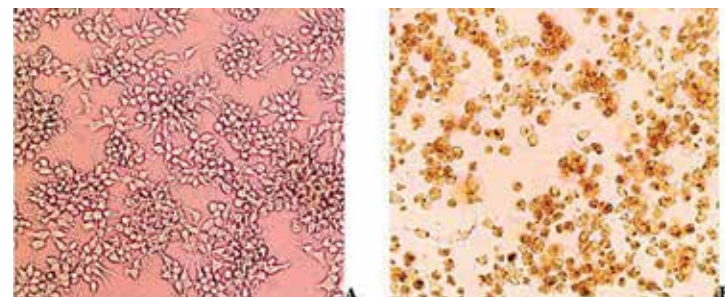
сравнение с последовательностями, опубликованными в международной базе данных GenBank (рис. 2). Сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности показал, что изолят принадлежит к виду С, идентичность изолята FAdV4/6/2009 по исследованному фрагменту гена гексона с другими штаммами этого вида составила 98,0–98,2%.

Патогенность полученного изолята аденовируса птиц была изучена на 7-сут. цыплятах-бройлерах.

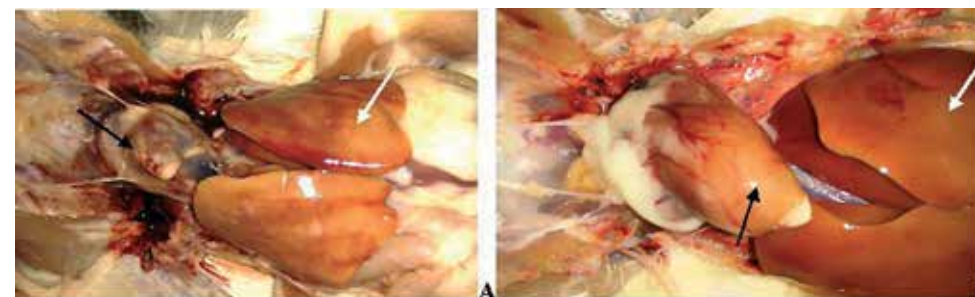
В течение периода наблюдения у цыплят опытной и контактной групп отмечали угнетенное состояние, вялость, потерю аппетита, истощение, взъерошенность перьевого покрова, опускание крыльев, затруднённое дыхание, диарею.

У экспериментально инфицированных цыплят проявление клинических признаков наблюдали начиная со 2 сут. после заражения, а у контактных птиц — с 5 сут. после подсадки к заражённым цыплятам. Падёж цы-

**Рис. 1.** Культура клеток LMH, неинфицированная (А) и инфицированная (В) изолятом аденовируса птиц FAdV4/6/2009, об. ×15, ок. ×10



**Рис. 3.** Патологические изменения во внутренних органах заражённых цыплят: А — 9 сут., В — 20 сут. после заражения. Стрелками показаны внутренние органы: черными — сердце, белыми — печень





**Таблица 2**  
Результаты выявления аденовируса птиц в ротоглоточных и клоакальных смывах

Группа	Период после заражения, сут					Всего
	3	6	9	14	20	
В ротоглоточных смывах						
Опытная	8/10*	4/10	2/10	3/10	0/10	17/50
Контактная	2/6	4/6	5/6	3/5	0/6	14/29
В клоакальных смывах						
Опытная	7/10	8/10	3/10	2/10	0/10	20/50
Контактная	0/6	1/6	2/6	5/5	0/6	8/29

\* количество проб, в которых выявлен геном вируса/общее количество отобранных проб.

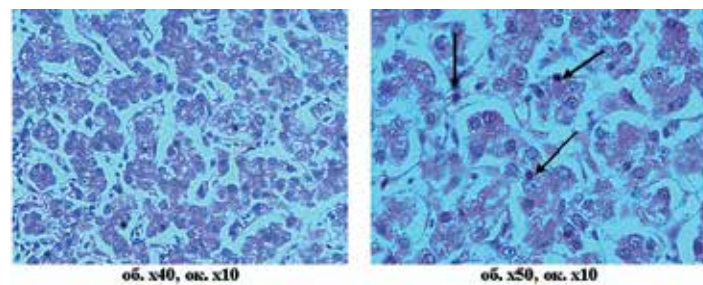


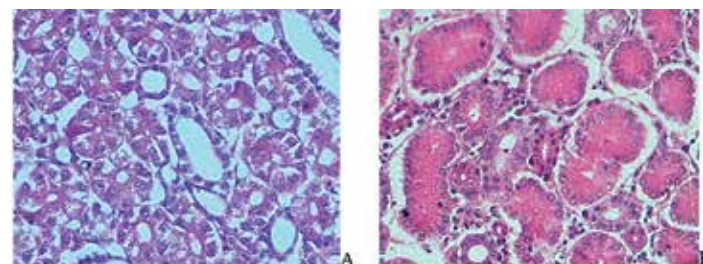
Рис. 4. Паренхима печени цыплёнка, экспериментально инфицированного аденовирусом (20 сут. после заражения). Стрелками показаны тельца-включения. Парафиновый срез, окр. гематоксилин и эозин

плет в опытной группе был отмечен через 4, 7, 12, 14 и 20 сут. после заражения (всего пало 6 птиц), в контактной группе — через 8 сут. после подсадки (пал один цыплёнок) (табл. 1).

При патологоанатомическом исследовании у цыплят обеих групп начиная с 4–6 сут. после заражения и до окончания эксперимента регистрировали изменения, характерные для синдрома гепатита-гидроперикардита. В перикарде отмечали скопление серозной жидкости, печень была увеличена, имела рыхлую консистенцию, светло-коричневый цвет либо неравномерную окраску с разлитыми кровоизлияниями под капсулой органа (рис. 3).

Почки были увеличены, поджелудочная железа с точечными кровоизлияниями, легкие уплотнены и отечны, в скелетных мышцах наблюдали кровоизлияния. При гистологическом исследовании в печени отмеча-

Рис. 5. Почки. А — здоровая ткань (контрольная группа), Б — поражённая ткань (инфицированная группа), 11 сут. после заражения. Парафиновый срез, окр. гематоксилин и эозин. об. x40, ок. x10



ли дистрофические изменения гепатоцитов, очаговые некрозы (рис. 4). В гепатоцитах обнаруживали тельца-включения.

В почках отмечали дистрофическое изменение эпителия канальцев, просветы дистальных, проксимальных канальцев и собирательных трубочек были заполнены слизистым секретом, содержащим десквамированные эпителиоциты и клеточный детрит (рис. 5).

Заражение цыплят аденовирусом также вызывало патологические изменения лимфоидных органов: тимус был уменьшен в размере, в некоторых случаях селезенка была увеличена, с кровоизлияниями, фабрициева сумка у некоторых цыплят была атрофирована. При гистологическом исследовании в селезенке наблюдали уменьшение количества лимфатических фолликулов в поле зрения, границы фолликулов были выражены нечётко. В фабрициевой сумке (бурсе) было отмечено уменьшение размера фолликулов и некробиотические изменения мозговой зоны.

Наличие ДНК аденовируса в органах и смывах цыплят было подтверждено методом ПЦР-РВ. В пробах от заражённых цыплят геном аденовируса был выявлен с 3 по 14 сут. после заражения и в ротоглоточных, и в клоакальных смывах (табл. 2).

У контактных птиц вирус обнаружен в ротоглоточных смывах со 2 по 13 сут. после подсаживания к инфицированным цыплятам, а в клоакальных смывах позднее — с 5 по 13 сут. после подсаживания (табл. 2).

При исследовании проб внутренних органов от убитых птиц ДНК аденовируса была обнаружена, начиная с 3 сут. после заражения, в печени (3, 6, 14, 24 сут.), почках (6 сут.), кишечнике (3, 6, 9, 24 сут.), бурсе (6 и 20 сут.) и селезенке (6 и 24 сут.) заражённых цыплят (табл. 3). Исследование внутренних органов от павших цыплят в различные сроки после заражения (4, 7, 9, 14 и 20 сут.) показало наличие генома аденовируса птиц во всех исследованных органах (печень, почки, кишечник, бурса, селезенка).

У цыплят контактной группы геном аденовируса птиц был выявлен с 5 сут. после контакта с заражёнными цыплятами в пробах печени (6, 9, 14 сут.), почек (6 и 14 сут.), кишечника (6, 9 и 14 сут.), бursы и селезенки (6, 9, 14 и 24 сут.) (табл. 3).

Выявление ДНК аденовируса в пробах от цыплят контактной группы показывает возможность горизонтальной передачи вируса при совместном содержании инфицированных и здоровых птиц.

В контрольной группе птицы были клинически здоровы. Патологических изменений органов у убитых птиц контрольной группы и случаев выявления генома аденовируса птиц в органах цыплят в течение периода наблюдения не регистрировали.

Экспериментальное заражение показало, что аденовирус птиц реплицировался во внутренних органах заражённых цыплят и оказывал на них патологическое действие, что подтверждено исследованиями других авторов [7, 10, 11, 13].

При исследовании сывороток крови в ИФА у заражённых цыплят были обнаружены специфические антитела к аденовирусу птиц (табл. 4).

Через 9 сут. после заражения антитела были выявлены у 3 цыплят из 9 исследованных, а через 24 сут. — у 5 из 8 исследованных цыплят из опытной группы. Средний титр антител по группе через 24 сут. после заражения составил  $957 \pm 320$ , а средний титр положительных проб —  $1438 \pm 360$ . У контрольных цыплят

в течение всего эксперимента специфические антитела не выявляли.

Результаты экспериментального заражения показали, что изолят аденовируса птиц FAdV4/06/2009 способен репродуцироваться в клетках внутренних органов кур (печени, почках), лимфоидных органах (селезенке, бурсе), вызывать синдром гидроперикардита у орально зараженных птиц и у птиц, находящихся с ними в контакте, а также образование специфических антител.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изолят, выявленный у 154-сут. кур и выделенный на культуре клеток LMN, был идентифицирован как аденовирус птиц вида С с помощью ПЦР и нуклеотидного секвенирования фрагмента гена гексона. При экспериментальном пероральном заражении цыплят он вызывал характерные для аденовирусной инфекции макро- и гистопатологические изменения тканей внутренних органов (печени, почек) и образование базофильных телец-включений в печени. Наличие аденовирусной ДНК в органах и смывах заражённых птиц было подтверждено методом ПЦР-РВ. Вирус индуцировал выработку специфических антител.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакулин В.А., Мурый В.А. Аденовирусный гепатит с включениями — гидроперикардит кур: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика // Био. — 2011. — № 12. — С. 28–30.
- Ельникова Е.В., Борисов В.В. Изучение патогенных свойств полевых изолятов аденовирусов кур, выделенных на территории РФ // Ветеринарная патология. — 2006. — № 4. — С. 126–131.
- Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens / D. Mittal, N. Jindal, A. Tiwari, R.S. Khokhar // Virus Dis. — 2014. — Vol. 25, № 1. — P. 114–119.
- Chronological analysis of gross and histological lesions induced by field strains of fowl adenovirus serotypes 1, 8b and 11 in one-day-old chickens / P. Steer, J. Sandy, D. Rourke [et al.] // Avian Pathol. — 2015. — Vol. 44. — P. 106–113.
- Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon Li gene region / A. Marek, A. Gunes, E. Schulz, M. Hess // J. Virol. Methods. — 2010. — Vol. 170. — P. 147–154.
- Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea / K. Choi, S. Kye, J. Kim [et al.] // Poultry Sci. — 2012. — Vol. 91. — P. 2502–2506.
- Fowl adenovirus (FAdV) serotype 4 causes depletion of B and T cells in lymphoid organs in specific pathogen-free chickens following experimental infection / E. Schoneville, A. Singh, T. Gobel [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2008. — Vol. 121. — P. 130–139.
- Hafez H.M. Avian adenoviruses infections with special attention to inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome and egg drop syndrome / Pakistan Vet. J. — 2011. — Vol. 31, № 2. — P. 85–92.
- Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review / Avian Pathol. — 2000. — Vol. 29. — P. 195–206.
- Immune system dysfunction in broiler chickens experimentally inoculated with fowl adenovirus serotype-4 associated with inclusion body hepatitis hydropericardium syndrome / I. Hussain, M. Mahmood, M. Arshad [et al.] // Turk. J. Vet. Anim. Sci. — 2012. — Vol. 36, № 3. — P. 223–230.
- Outbreaks of inclusion body hepatitis (IBH) in chickens; pathological studies and isolation of fowl adenovirus / V. Kumar, R. Kumar, R. Chandra [et al.] // Advan. Animal Vet. Sci. — 2013. — Vol. 1 (35) — P. 21–24.
- Pathogenicity and cytokine gene expression pattern of a serotype 4 fowl adenovirus isolate / H. Grgic, Z. Poljak, S. Sharif, E. Nagy // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8. — URL: <http://www.journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077601>.
- Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China / J. Zhao, Q. Zhong, Y. Zhao [et al.] // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10. — URL: <http://www.journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133073>.

**Таблица 3**  
Результаты выявления аденовируса птиц во внутренних органах кур

Группа	Проба	Период после заражения, сут.					
		3	6	9	14	20	24
Опытная	печень	1/3*	2/3	0/3	3/3	0/3	1/3
	почки	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	кишечник	2/3	3/3	1/3	0/3	0/3	1/3
	бурса	0/3	1/2	н/и	н/и	1/3	0/3
	селезенка	н/и	2/3	н/и	н/и	0/3	1/3
Контактная	печень	н/и	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2
	почки	н/и	2/2	0/2	1/2	0/2	0/2
	кишечник	н/и	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
	бурса	н/и	2/2	1/2	1/1	н/и	1/1
	селезенка	н/и	2/2	1/2	1/2	н/и	1/1

\* количество проб, в которых выявлен геном вируса/общее количество отобранных проб; н/и — не исследовали.

**Таблица 4**  
Результаты выявления антител к аденовирусу птиц в ИФА

Группа	Сутки после заражения		
	0	9	24
Контрольная	$199 \pm 58^a$ — $0/8^c$	$268 \pm 97$ — 0/10	$2 \pm 1$ — 0/8
Опытная		$302 \pm 154$ $760 \pm 352$ 3/9	$957 \pm 320$ $1438 \pm 360$ 5/8

<sup>a</sup> средний титр антител по группе;

<sup>b</sup> средний титр антител положительных проб;

<sup>c</sup> отношение количества положительных проб к общему количеству проб в группе.



# РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БЕШЕНСТВУ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.В. Бельчихина<sup>1</sup>, А.К. Караулов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: belchihina@arriah.ru

<sup>2</sup> руководитель Информационно-аналитического центра, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: karaulov@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

В работе представлен ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации в 2007–2014 гг. Изучена видовая структура случаев бешенства среди животных за данный период, а также составлен прогноз вероятности возникновения случаев бешенства у животных в Российской Федерации на 2015 г.

Ключевые слова: бешенство, эпизоотическая ситуация, ретроспективный анализ, прогноз, Российская Федерация.

# RETROSPECTIVE ANALYSIS OF RABIES EPIZOOTIC SITUATION IN ANIMALS IN THE TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION

A.V. Belchihina<sup>1</sup>, A.K. Karaulov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: belchihina@arriah.ru

<sup>2</sup> Head of the Information Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: karaulov@arriah.ru

## SUMMARY

The retrospective analysis of rabies epizootic situation in animals in the territory of the Russian Federation in 2007–2014 is described in the article. The species composition of rabies in animals for this period is studied and the forecast of the probability of rabies occurrence in animals in the Russian Federation for 2015 is made.

Key words: rabies, epizootic situation, retrospective analysis, forecast, the Russian Federation.

## ВВЕДЕНИЕ

В мире на современном этапе наблюдается рост рабической инфекции, такая же закономерность отмечается и в Российской Федерации (РФ). В течение последних двух десятилетий на территории России отмечалось ухудшение эпизоотологической обстановки по бешенству. Сложившаяся ситуация была обусловлена социально-экономическими факторами, возникшими в основном в начале 1990-х гг., которые не позволяли проводить комплексные профилактические мероприятия, следствием чего явилось неконтролируемое увеличение количества основных носителей рабического вируса — лисиц, а также увеличение популяции бродячих собак и кошек, поддерживающих эпизоотию в антропоургических очагах инфекции. Так, если в РФ до 80-х гг. прошлого века число лиц, ежегодно обращавшихся за антирабической помощью, не превышало 200 тыс. человек, то с середины 1990-х гг. число людей, пострадавших от укусов животных, стало превышать 400 тыс., из которых каждый четвертый — ребенок [3].

Учитывая напряженную эпизоотологическую обстановку и социальные аспекты бешенства, а также не всегда и не до конца изученную природу возникновения и существования очагов бешенства и в связи со сложностью вопроса относительно резервуара инфекции, нам представляется целесообразным проведение ретроспективного анализа эпизоотической ситуации по бешенству среди животных и прогнозирование возможного возникновения/распространения болезни в 2015 г. на территории РФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При анализе эпизоотической обстановки по бешенству в РФ использовались данные Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (г. Москва), ФГБУ «Центр ветеринарии» (г. Москва), Роспотребнадзора (г. Москва) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Информационно-аналитический центр Управления ветеринарного надзора, г. Владимир).

Для определения территориально-географической привязки случаев бешенства к карте применялась поисковая система Google Earth Pro и электронные карты России (ИНГИТ). Визуализация полученных координат выполнена с помощью программы GIS ArcMap 9.3.

Расчеты по прогнозированию вероятности возникновения/распространения бешенства животных на территории РФ в 2015 г. были проведены в программе «@RISK» с применением функции Poisson и метода Монте-Карло (Monte-Carlo).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

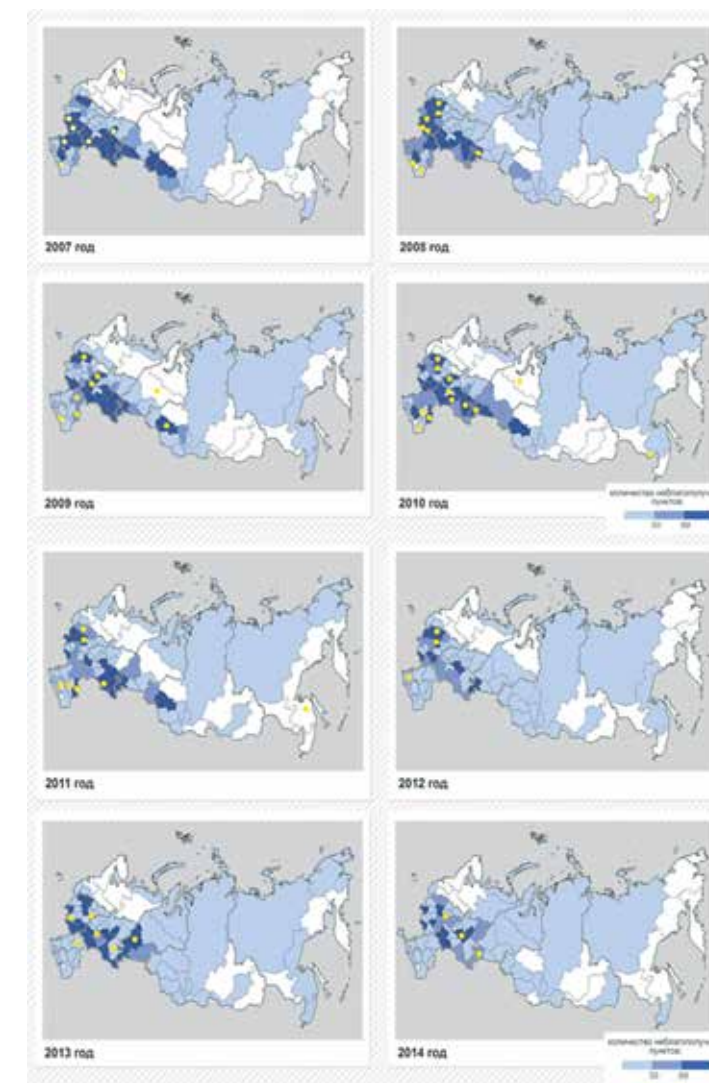
По данным официальной статистики (итоговые сведения ФГБУ «Центр ветеринарии») и оперативной информации, ежемесячно поступающей из субъектов РФ, эпизоотическая ситуация по бешенству на территории РФ остается нестабильной на протяжении последних лет. В течение 12 месяцев 2014 г. в РФ было выявлено 2096 неблагополучных пунктов и 2315 случаев по бешенству животных. Однако, несмотря на снижение числа заболевших животных по сравнению с 2007–2013 гг., сохраняется высокий уровень заболеваемости, а также отмечается распространение эпизоотии на территории, ранее свободные от бешенства (рис. 1).

Случаи бешенства животных за последние 8 лет (2007–2014 гг.) регистрировались более чем в 60 субъектах РФ и в основном сосредоточены в западных и юж-

ных субъектах РФ. Наиболее неблагополучные регионы по данному заболеванию находятся в Центральном и Приволжском федеральных округах (ФО) (среднее количество выявленных случаев бешенства составило 1536 (977 — 2014 г.) и 1122 (833 — 2014 г.) соответственно (рис. 1)). На долю перечисленных ФО приходится около 70% всех зарегистрированных случаев заболевания животных и 73% выявленных эпизоотических очагов. Однако следует отметить, что регистрируются также единичные случаи бешенства у животных на территории Дальневосточного ФО (среднее количество выявленных случаев бешенства не превышает 26 в год), которые составляют 0,3% от общего количества выявленных случаев бешенства на территории РФ (табл. 1).

Также хотелось отметить, что на протяжении всего анализируемого периода в наибольшей степени неблагополучие по бешенству регистрируется в таких регионах, как Белгородская область (среднее количество регистрируемых случаев бешенства в год составляет 193), Московская область (среднее количество регистрируемых случаев бешенства в год составляет 181), Пензенская область (среднее количество регистрируемых случаев бешенства в год составляет 153), Саратовская область (среднее количество регистрируемых случаев бешенства в год составляет 173) и Республика

Рис. 1. Неблагополучные территории по бешенству и случаи гидрофобии в РФ в 2007–2014 гг.



Год	Название ФО	ЦФО	СЗФО	ЮФО	СКФО	ПФО	УФО	СФО	ДФФО	КФО	Итого по РФ
2007	кол-во н/п	1710	52	526	200	1429	280	359	6		4562
	кол-во случ.	1935	61	590	234	1732	333	610	8		5503
2008	кол-во н/п	1805	100	355	178	905	177	236	4		3760
	кол-во случ.	2048	301	448	220	1026	246	343	4		4636
2009	кол-во н/п	1163	94	213	136	1632	190	311	16		3755
	кол-во случ.	1292	101	244	150	1920	222	494	19		4442
2010	кол-во н/п	1540	68	253	187	1259	385	226	5		3923
	кол-во случ.	1651	81	302	205	1408	483	299	8		4437
2011	кол-во н/п	1232	62	206	114	625	264	233	15		2751
	кол-во случ.	1279	65	238	124	673	500	283	26		3188
2012	кол-во н/п	1254	51	125	118	665	212	102	7		2534
	кол-во случ.	1288	57	143	152	776	265	113	8		2802
2013	кол-во н/п	1158	30	120	114	1035	404	131	11		3003
	кол-во случ.	1225	83	129	119	1215	573	151	12		3507
2014	кол-во н/п	878	15	128	91	762	139	70	4	9	2096
	кол-во случ.	977	17	132	95	833	161	86	5	9	2315
Итого за период	кол-во н/п	10740	472	1926	1138	8312	2051	1668	68	9	26384
	кол-во случ.	11695	766	2226	1299	9583	2783	2379	90	9	30830

ЦФО — Центральный ФО; СЗФО — Северо-Западный ФО; ЮФО — Южный ФО; СКФО — Северо-Кавказский ФО;

ПФО — Приволжский ФО; УФО — Уральский ФО; СФО — Сибирский ФО; ДВФО — Дальневосточный ФО; КФО — Крымский ФО;

н/п — неблагополучные пункты; кол-во случ. — количество случаев бешенства.

Татарстан (среднее количество регистрируемых случаев бешенства в год составляет 231).

В свою очередь, отмечаются такие регионы, где случаи бешенства никогда не регистрировались, данные субъекты в основном сосредоточены в Дальневосточном ФО (Камчатская область, Магаданская область, Сахалинская область, Еврейский АО) и Северо-Западном ФО (Ленинградская область, Мурманская область, Архангельская область и г. Санкт-Петербург) (рис. 1).

На протяжении последних 17 лет (1997–2014 гг.) резко активизировались природные очаги этой болезни, увеличилось число случаев заболевания среди диких, домашних плотоядных и сельскохозяйственных животных. Как свидетельствует анализ данных за период наблюдения с 1980 по 2014 гг., основной вклад в рост неблагополучия и заболеваемости бешенством вносят домашние и дикие животные, в то время как заболеваемость сельскохозяйственных животных держится на неизменном стабильном уровне. В целом ситуация по бешенству у сельскохозяйственных животных в России стационарна. Существенных изменений в проценте неблагополучных пунктов с поражением сельскохозяйственных животных не наблюдается в течение десятилетий. Савватеев А.И. указывал, что в России с 1907 по 1924 гг. неблагополучие, связанное с сельскохозяйственными животными, занимает в структуре заболевания не более 28%, а в 2014 г. этот показатель составил 12% [2].

Наибольшее число случаев бешенства в 2007–2014 гг. в России зарегистрировано среди диких животных (50%), за которыми следуют домашние плотоядные животные (32%) (собаки и кошки) и сельскохозяйственные животные (18%). Долевое распределение диких

плотоядных животных и домашних плотоядных животных в ФО РФ составляет соотношение в среднем один к трем (Северо-Западный ФО, Уральский ФО, Сибирский ФО и Дальневосточный ФО) и один к двум (Центральный ФО и Приволжский ФО), и в двух ФО (Южном и Северо-Кавказском) количество зарегистрированных случаев бешенства у домашних плотоядных животных в 2,5 раза выше, чем у диких животных (табл. 2, рис. 2). Также хотелось отметить, что в Северо-Кавказском ФО в последнее шесть лет зарегистрировано в 3 раза больше случаев бешенства у сельскохозяйственных животных, чем у диких животных, а в Сибирском ФО количество случаев бешенства у сельскохозяйственных животных больше в 2 раза, чем у домашних животных (табл. 2).

По статистическим данным Роспотребнадзора, в РФ за последние восемь лет зарегистрировано 79 случаев гидрофобии на территории 35 субъектов РФ. Также хотелось отметить, что половина случаев гидрофобии зарегистрирована у жителей сельских поселений (41 случай). Наиболее неблагополучные регионы по данному заболеванию находятся в Центральном (30 случаев), Южном (14 случаев), Приволжском (14 случаев), Северо-Кавказском (9 случаев) ФО РФ (табл. 3).

Наибольшее количество смертельных случаев у людей от бешенства отмечается в 2008–2011 гг. — 66 случаев, среднее количество которых в год составляет 13. Основными неблагополучными регионами являются Тверская (9 случаев), Астраханская (8 случаев), Московская (5 случаев) области, г. Москва (6 случаев) и Республика Дагестан (5 случаев). В свою очередь, хотелось отметить, что на территории Тверской области случаи бешенства у людей регистрировались непрерывно

Название ФО	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Всего за 2007–2014 гг.	
ЦФО	дик. жив.	949	1105	808	969	794	766	638	561	6590
	дом. жив.	565	768	383	565	420	414	488	332	3935
	с/х жив.	420	175	100	117	65	107	98	84	1166
СЗФО	дик. жив.	44	81	60	46	47	43	26	12	359
	дом. жив.	16	24	29	26	15	12	2	1	125
	с/х жив.	1	1	9	3	3	2	0	0	19
ЮФО	дик. жив.	186	83	50	50	48	27	29	20	493
	дом. жив.	243	237	145	160	141	99	72	81	1178
	с/х жив.	0	0	48	89	49	17	28	31	262
СКФО	дик. жив.	39	20	14	26	7	16	5	10	137
	дом. жив.	101	112	86	71	55	58	63	48	594
	с/х жив.	0	0	50	101	62	78	51	37	379
ПФО	дик. жив.	916	564	982	708	291	373	516	465	4815
	дом. жив.	429	300	496	397	262	257	456	267	2864
	с/х жив.	387	162	442	302	120	146	243	101	1903
УФО	дик. жив.	224	128	155	353	205	182	358	99	1704
	дом. жив.	51	40	37	81	77	60	95	44	485
	с/х жив.	58	31	30	49	28	23	40	8	267
СФО	дик. жив.	283	184	255	158	128	65	84	51	1208
	дом. жив.	73	101	74	59	80	19	42	13	461
	с/х жив.	253	58	165	81	75	28	25	22	707
ДФФО	дик. жив.	6	4	12	7	19	8	7	5	68
	дом. жив.	1	0	5	0	4	0	5	0	15
	с/х жив.	1	0	0	1	0	0	0	0	2
КФО	дик. жив.							4		4
	дом. жив.							4		4
	с/х жив.							1		1

дик. жив. — дикие животные; дом. жив. — домашние животные; с/х жив. — сельскохозяйственные животные.

на протяжении пяти лет (2008–2012 гг.), а в г. Москве (2010–2012 гг.) и Астраханской области (2009–2011 гг.) на протяжении трех лет. А в 20 субъектах страны: Белгородская, Орловская области, республики Ингушетия, Северная Осетия – Алания, Чеченская, Ставропольский, Хабаровский края, Ханты-Мансийский АО, Краснодарский край, Республика Мордовия, Мурманская, Новосибирская, Оренбургская, Ростовская, Самарская, Саратовская, Свердловская области, Республика Татарстан, Удмуртская Республика и Ямало-Ненецкий АО — отмечаются спорадические случаи бешенства у людей (табл. 3). Отмечаются такие субъекты страны, в которых случаи гидрофобии были зарегистрированы (Мурманская область — 2007 г., Еврейская АО — 2008 и 2010 гг., Ханты-Мансийский АО — 2009 г., Ямало-Ненецкий АО — 2010 г., Хабаровский край — 2011 г.), а случаи бешенства у животных на данных территориях отсутствовали. Сразу возникает вопрос: были ли эти случаи привозными или в регионах проводится недостаточная диагностика бешенства у животных? (рис. 1).

По статистическим данным Роспотребнадзора, в РФ число лиц, получающих различные повреждения от

животных, в последние годы составляет более 432 тыс. человек, а число получивших антирабическую помощь в среднем по стране составляет 300 человек на 100 тыс. населения. Ежегодно более 250 тыс. человек подвергаются риску заражения вирусом бешенства и нуждаются в проведении специфического лечения с использованием антирабической вакцины, в то же время около 40 тыс. человек должны получать дополнительно антирабический иммуноглобулин [1]. Больше число случаев укусов, ослюнений и оцарапываний людей отмечается у городских жителей (75%), чем у сельских (25%). Кроме этого, число повреждений людей домашними плотоядными животными в несколько раз больше (97%), чем дикими (3%) (табл. 4). Из этого следует, что уровень контактов населения с домашними плотоядными животными выше, чем с дикими животными. Подобная ситуация складывается как в городах, так и в сельской местности, и причина смерти людей от бешенства зачастую связана именно с домашними плотоядными, что доказывает гипотезу о доминировании риска заражения бешенством от домашних плотоядных в большей степени, чем от диких животных.



Таблица 3  
Динамика изменения числа случаев бешенства у людей в РФ (2007–2014 гг.)

Название субъекта РФ	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		Всего	
	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.	всего	из них у жителей сельс. пос.
РФ	8	5	17	8	12	7	16	7	13	6	4	2	6	4	3	2	79	41
Воронежская обл.	2	2	2	2													4	4
Курская обл.	1	1											1	1			2	2
Белгородская обл.			1	1													1	1
г. Москва			1	0			2	0	2	0	1	0					6	0
Московская обл.			3	1					1	0	1	1					5	2
Орловская обл.			1	1													1	1
Тверская обл.			1	1	3	1	1	1	3	2	1	1					9	6
Владимирская обл.													1	0	1	1	2	1
Мурманская обл.	1	0															1	0
Р. Ингушетия					1	1											1	1
Р. Северная Осетия – Алания			1	0													1	0
Р. Дагестан			4	2			1	1									5	3
Чеченская Р.	1	1															1	1
Ставропольский край									1	1							1	1
Ростовская обл.	1	1															1	1
Р. Калмыкия							1	0	1	1							2	1
Краснодарский край											1	0					1	0
Астраханская обл.					2	2	3	1	3	2							8	5
Волгоградская обл.					1	1							1	1			2	2
Р. Татарстан															1	0	1	0
Оренбургская обл.									1	0							1	0
Ульяновская обл.							1	1					1	1			2	2
Самарская обл.							1	1									1	1
Р. Башкортостан							1	1					1	1			2	2
Удмуртская Р.	1	0															1	0
Саратовская обл.	1	0															1	0
Р. Мордовия					1	1											1	1
Нижегородская обл.					2	1	2	0									4	1
Челябинская обл.			2	0			1	0							1	1	4	1
Ханты-Мансийский АО					1	0											1	0
Ямало-Ненецкий АО							1	0									1	0
Свердловская обл.													1	0			1	0
Новосибирская обл.					1	0											1	0
Хабаровский край									1	0							1	0
Еврейская АО			1	0			1	1									2	1

При проведении прогнозирования вероятности распространения бешенства у животных на территории РФ в 2015 г. было выявлено, что в среднем ожидается возникновение 3818 случаев бешенства у различных видов животных (дикие, домашние плотоядные и сельскохозяйственные животные), из них 1931 случай

бешенства приходится на диких животных, 1218 случаев — на домашних плотоядных и 669 случаев — на сельскохозяйственных животных. А при критическом сценарии (пессимистический прогноз) следует ожидать до 4003 случаев бешенства среди животных (дикие, домашние плотоядные и сельскохозяйственные

БЕШЕНСТВО RABIES

БЕШЕНСТВО RABIES

животные); до 2075 случаев — среди диких животных; до 1332 случаев — среди домашних плотоядных животных и до 759 случаев — среди сельскохозяйственных животных (рис. 3).

Рассмотрим наиболее детально вероятность распространения бешенства в 2015 г. на территории РФ. Наибольшая вероятность возникновения бешенства у животных различных видов (от 100 до 200 случаев) отмечается в следующих регионах: Белгородская область — 193 случая, Воронежская область — 132 случая, Липецкая область — 126 случаев, Московская область — 181 случай, Тверская область — 119 случаев, Республика Башкортостан — 144 случая, Оренбургская область — 134 случая, Пензенская область — 144 случая, Саратовская область — 174 случая и Самарская область — 101 случай. В 31 субъекте вероятность возникновения бешенства минимальна и не превышает 10 случаев, данные регионы в основном сосредоточены в Дальневосточном и Северо-Западном ФО (рис. 4). Наибольшая вероятность распространения бешенства у диких животных отмечается в Пензенской области — 55 случаев, Тверской области — 90 случаев, Челябинской области — 95 случаев, Республике Татарстан — 134 случая и Московской области — 141 случай. Также отмечаются регионы, в которых вероятность возникновения бешенства у диких животных равна 0, к ним относятся Республика Коми, Вологодская область, Республика Ингушетия, Чеченская Республика, Хабаровский край и Амурская область. В 28 субъектах вероятность распространения бешенства не превышает 10 случаев, и данные регионы в основном сосредоточены в Северо-Кавказском, Дальневосточном и Северо-Западном ФО. В свою очередь, максимальная возможность возникновения бешенства у домашних плотоядных животных отмечается в таких регионах, как Оренбургская область — 55 случаев, Саратовская область — 65 случаев, Воронежская область — 75 случаев и Брянская область — 109 случаев. А у сельскохозяйственных животных в Новосибирской области — 28 случаев, Саратовской области — 30 слу-

Таблица 4  
Укусы, ослюнения, оцарапывания животными людей в РФ (2007–2014 гг.)

Год	Количество укусов, ослюнений, оцарапываний					
	от всех видов животных			от диких животных		
	всего	в т.ч. у сельских жителей	в т.ч. у городских жителей	всего	в т.ч. у сельских жителей	в т.ч. у городских жителей
2007	405664	96362	309302	6957	2930	4027
2008	432231	98143	334088	7123	2528	4595
2009	431972	98519	333453	7800	2773	5027
2010	410939	94951	315988	7719	2791	4928
2011	405664	92295	313369	7214	2228	4986
2012	409298	95363	313935	8645	2492	6153
2013	380793	91710	289083	8135	2540	5595
2014	371930	85568	286362	8364	2240	6124

чаев, Республике Тыва — 31 случай, Оренбургской области — 45 случаев, Республике Татарстан — 49 случаев и Республике Башкортостан — 58 случаев. Также хотелось отметить тот факт, что у более половины субъектов вероятность распространения бешенства как у домашних, так и у сельскохозяйственных животных не превышает 10 случаев, и данные субъекты находятся в Северо-Западном, Северо-Кавказском, Сибирском и Дальневосточном ФО (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент ситуация по рабической инфекции в большинстве субъектов РФ остается напряженной.

С 2007 по 2014 гг. зарегистрировано 26 384 неблагополучных пункта по бешенству, которые в основном сосредоточены в западных и южных субъектах РФ. Наибольшее число неблагополучных пунктов фиксируется в Центральном и Приволжском ФО РФ.

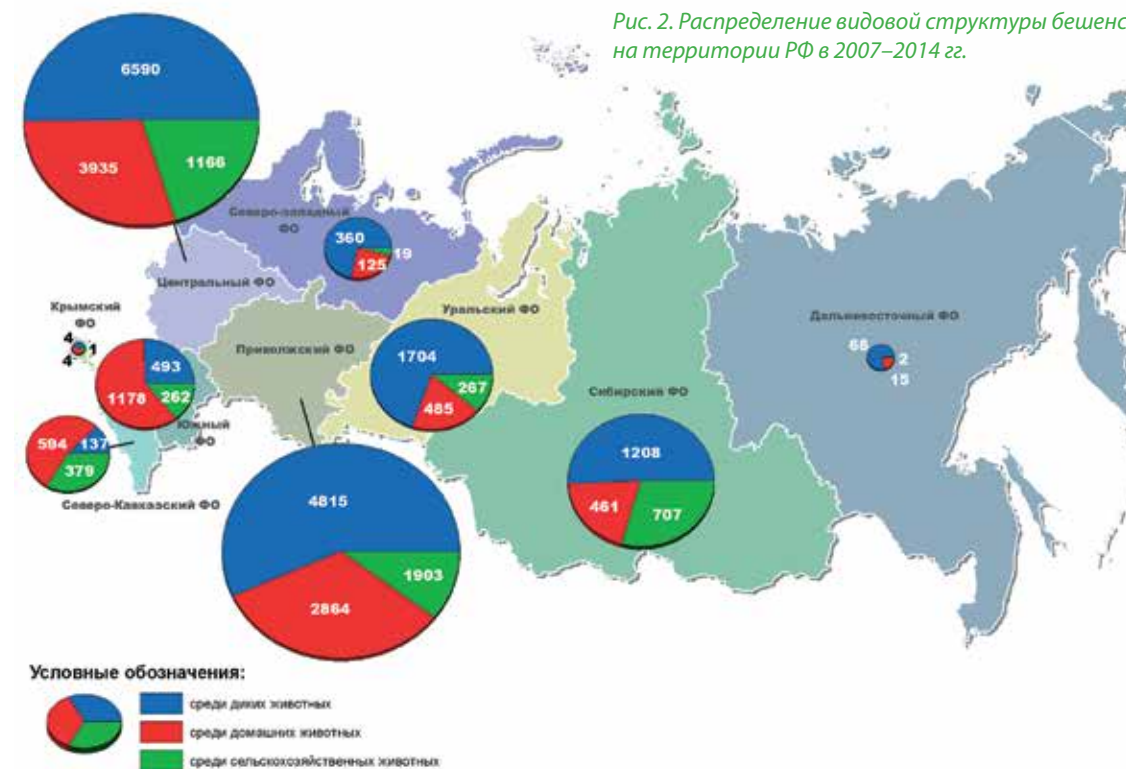
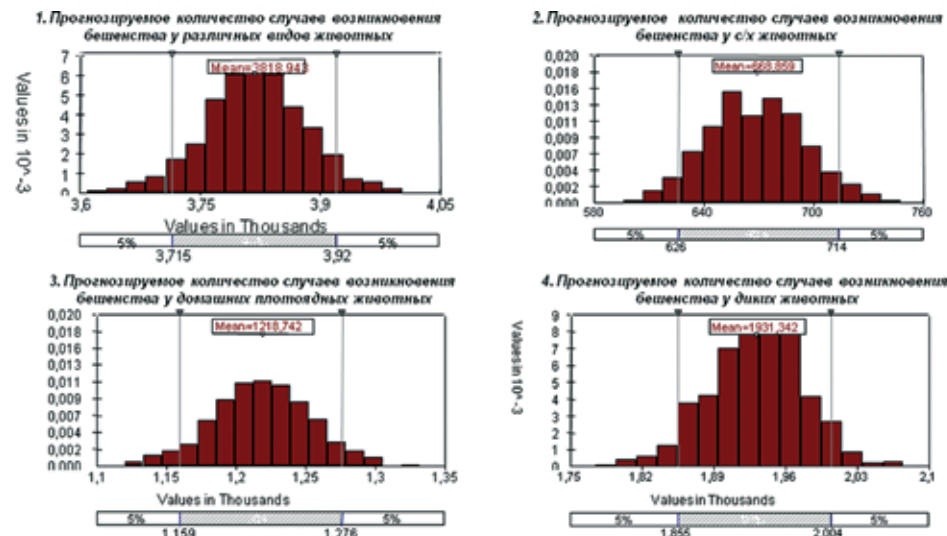


Рис. 2. Распределение видовой структуры бешенства на территории РФ в 2007–2014 гг.





Выходные данные	Прогнозируемое количество случаев бешенства у животных в РФ в 2015 г.			
	Всего (домашние плотоядные и дикие животные)	Домашние животные	Домашние плотоядные животные	Дикие животные
Минимум	3609	1754	1120	585
Максимум	4003	2075	1332	759
Среднее	3818	1931	1218	669
Стандартное отклонение	62	46	35	26
Варианса	3866	2145	1207	701

Рис. 3. Результаты моделирования ситуации по случаям бешенства животных в РФ в 2015 г.

Наибольшее число случаев бешенства в РФ в 2007–2014 гг. отмечается среди диких животных — 15 378 (50%), за которыми следуют домашние плотоядные животные — 9661 (30%), а доля сельскохозяйственных животных составляет всего лишь 18% (5183).

За последние восемь лет зарегистрировано 79 случаев гидрофобии, из них половина — у жителей сельских поселений (41 случай). Наиболее неблагополучные регионы по данному заболеванию находятся в Центральном, Южном, Приволжском и Северо-Кавказском ФО РФ. Больше число случаев укусов, ослюнений и оцарапываний людей отмечается у городских жителей (75%), чем у сельских (25%), при этом большее число повреждений людей в основном приходится от домашних плотоядных (97%), чем от диких животных (3%).

Результаты моделирования ситуации по бешенству животных показывают, что в течение 2015 г. на территории РФ, в среднем, возможно возникновение 3818 случаев бешенства у различных видов животных (дикие, домашние плотоядные и сельскохозяйственные животные), 1931 случай бешенства — среди диких животных, 1218 случаев — среди домашних плотоядных животных и 669 случаев — среди сельскохозяйственных животных.

Полученные результаты ретроспективного анализа эпизоотической ситуации по бешенству в РФ и составленный прогноз вероятности распространения случаев бешенства в стране можно/необходимо использовать ветеринарным службам регионов РФ в качестве инструмента для проведения научно обоснованных мероприятий по ветеринарному надзору, мониторингу, контролю, наблюдению за эпизоотическим состоянием при бешенстве. Это позволит осуществлять контроль и совершенствовать программу оздоровления животноводства, наиболее оптимально распределять средства и усилия по выявлению и диагностике бешенства.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. О заболеваемости бешенством в Российской Федерации. — URL: [http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic\\_situation](http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation) (дата обращения: 17.11.15).
2. Саватеев А.И. Бешенство. — М.: Госиздат, 1927. — 216 с.
3. Черкасский Б.Л., Хадарцев О.С., Мовсисянц А.А. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации // Вакцинация. — 2005. — № 1 (37). — С. 2–5.
4. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. — URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html> (дата обращения: 16.11.15).



Рис. 4. Прогнозирование вероятности возникновения бешенства у животных на территории РФ в 2015 г.

**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 являются 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 ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ 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, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300-500 знаков с пробелами);
6. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи;

7. Введение;
8. Материалы и методы;
9. Результаты и обсуждения;
10. Выводы и заключение;
11. Список литературы (т.е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008. Не более 5-7 источников;
12. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек

на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно);  
**13.** Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии/руководителя, заверенные круглой печатью учреждения.

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

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

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

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

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Ветеринария сегодня» можно оформить через каталог «Газеты. Журналы» ОАО Агентство «Роспечать». Подписной индекс издания 70460. Стоимость подписки на полугодие (два выпуска 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. Юрьевец  
 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 и птиц.



### ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРА В ОБЛАСТИ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ СВИНЕЙ ЯВЛЯЮТСЯ:

– разработка и внедрение в ветеринарную практику высокоэффективных лечебно-профилактических и диагностических препаратов против болезней свиней.

#### ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ ВАКЦИНЫ:

– против инфекционных болезней свиней: пастереллеза, сальмонеллеза, гемофиллезного полисерозита свиней, актинобациллезной плевропневмонии свиней, репродуктивно-респираторного синдрома, парвовирусной инфекции, болезни Ауески и трансмиссивного гастроэнтерита свиней;  
– против ящура всех типов.

#### ДИАГНОСТИКУМЫ:

– диагностические исследования на ящур всех типов;

– диагностические исследования на наличие вируса АЧС и КЧС;  
– выделение вируса болезни Ауески в культуре клеток;  
– обнаружение респираторных болезней свиней;  
– исследования на наличие коронавирусов свиней;  
– мониторинговые и скрининговые исследования инфекционных болезней свиней;  
– дифференциальная диагностика желудочно-кишечных болезней;  
– дифференциальная диагностика болезней свиней, протекающих с поражением центральной нервной системы.

**По вопросам проведения исследований обращаться по тел.: (4922) 26-15-25 (доб. 21-35)**

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 свиней. Ученые Центра ведут научное сопровождение продукции ФГБУ



«ВНИИЗЖ» и непрерывную консультативную 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 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/UCVPBOvjJZcxbEmJ1Qw3Yycw>